

Brasilialainen *Nostoc* sp. CENA543 –syanobakteeri ja sen tuottamat
bioaktiiviset aineet

Lassi Heinilä
Pro Gradu
Helsingin yliopisto
Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos
Mikrobiologia
2017

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Lassi Matti Petteri Heinilä			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Brasilialainen <i>Nostoc</i> sp. CENA543 –syanobakteeri ja sen tuottamat bioaktiiviset aineet			
Oppiaine – Läroämne – Subject Mikrobiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro Gradu	Aika – Datum – Month and year Marraskuu 2017	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 84 + 7	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Syanobakteereita eli sinileviä kasvaa runsaasti kaikkialla maapallolla erilaisissa ympäristöissä maalla, vedessä ja symbiooseissa muiden organismien kanssa. Syanobakteerit ovat maailman historian ensimmäisiä oksygeenisiä fotosynteteesisiä organismeja ja monet pystyvät myös sitomaan ilmakehän typpeä, jonka vuoksi ne ovat tärkeitä alkutuottajia monissa ekosysteemeissä. Parhaiten syanobakteerit tunnetaan arkipuheessa kuitenkin niiden myrkyllisyyden takia. Syanobakteerit tuottavat lukemattomia bioaktiivisia aineita, joista monet ovat muille organismeille myrkyllisiä. Näiden aineiden joukosta on löydetty myös mahdollisuus uusien lääkeaineiden kehittämiseen. Suuri osa näistä bioaktiivisista aineista tuotetaan ei-ribosomaalisen peptidisynteesin ja polyketidisynteesin kautta.</p> <p><i>Nostoc</i> sp. CENA543 on Brazilian Pantanal-kosteikolta eristetty syanobakteeri, jonka huomattiin tuottavan maksamyrkyllistä nodulariinia, bioaktiivisia anabaenopeptiinejä ja aikaisemmin tuntematonta peptidiä. Tässä työssä selvitettiin tuon aikaisemmin tuntemattoman peptidin kemiallinen rakenne, tuotantomäärä, sen tuotantoon käytettyjen geenirykelmien toiminta ja trypsiini entsyymiaktiivisuuden inhibiitiovoimakkuus. Lisäksi tutkittiin nodulariinin määrä sekä nodulariinin ja anabaenopeptiinin tuotantoon käytettyjä biosynteesigeenejä. Eräänä tutkimuskohteena oli myös optimaalisten kasvatusolosuhteiden tutkiminen.</p> <p>Uuden yhdisteen kemiallisen rakenteen selvittämisessä käytettyjä keskeisimpiä menetelmiä olivat nestekromatografia ja massaspektrometria. Uuden yhdisteen, nodulariinin ja anabaenopeptiinin biosynteesigeenien tutkimisessa käytettiin DNA:n eristystekniikoita ja bioinformatiikan menetelmiä, esimerkiksi AntiSMASH, BLAST, Artemis ja BioEdit -ohjelmia. Kasvatusolosuhteita tutkittiin erilaisilla kasvatusalustoilla. Yhdisteiden bioaktiivisuutta tutkittiin kiekкодиффузиотестеillä ja trypsiini-inhibitiota Kawabatan entsyymiaktiivisuusmetodilla.</p> <p>Työn tuloksena todettiin <i>Nostoc</i> sp. CENA543-kannan tuottavan nodulariinia selvästi myrkyllisinä määrinä. Uuden, spumigiineja läheisesti muistuttavan peptidiryhmän nimeksi annettiin pseudospumigiini. Pseudospumigiineja löydettiin kuusi eri varianttia, joista selvästi suurin tuotto oli Pseudospumigiini A:lla, jonka rakenne on Hpla-D-Hty-L-Ile-Argininaali ja massa 612,4 Da. Nodulariinin ja anabaenopeptiinin biosynteesigeenit vastasivat rakenteeltaan <i>Nodularia spumigena</i> CCY9414 vastaavia geenejä. Pseudospumigiinin biosynteesigeenit muistuttivat huomattavasti <i>Nodularia spumigena</i> CCY9414 – kannan spumigiinin biosynteesigeenejä. Adenylaatiodeomeenin substraattispesifisyyden muutos ja kolmen ja kolmen muun geenin deletio selittäisi pseudospumigiinin ja spumigiinin eron.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Anabaenopeptiini, nodulariini, <i>Nostoc</i> , NRPS, PKS, pseudospumigiini, syanobakteerit,			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, mikrobiologian käsikirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Pro gradu työtä ovat ohjanneet professori Kaarina Sivonen, dosentti Jouni Jokela, dosentti David Fewer ja Anu Humisto			

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos – Institution – Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä – Författare – Author Lassi Matti Petteri Heinilä			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Brazilian <i>Nostoc</i> sp. CENA543 –cyanobacteria and bioactive compounds			
Oppiaine – Läroämne – Subject Microbiology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis	Aika – Datum – Month and year November 2017	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 84 + 7	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Cyanobacteria, also referred as blue-green algae, are abundant everywhere on earth inhabiting terrestrial and marine environments and living in symbiosis with several other organisms. Cyanobacteria were the first oxygenic photosynthetic organisms on earth and many species are also capable of fixing atmospheric nitrogen which makes them important primary producers in many ecosystems. Cyanobacteria are nevertheless best known for producing toxic compounds. Cyanobacteria produce a variety of bioactive compounds including toxic ones. Some of these compounds have a potential as drugs. Most of these compounds are produced by nonribosomal peptide synthetases and polyketide synthases.</p> <p><i>Nostoc</i> sp. CENA543 is a cyanobacteria isolated from Brazilian wetland Pantanal. The strain was found to produce hepatotoxic nodularin, bioactive anabaenopeptins and a previously unknown peptide. In this work the chemical structure and the biosynthetic gene cluster of the unknown peptide were characterized. Amount of produced nodularin was measured and biosynthetic genes of nodularin and anabaenopeptins were examined. Also the optimal growth conditions for the strain were studied.</p> <p>Essential methods applied in this work were liquid chromatography and mass spectrometry. To examine the biosynthetic genes DNA extraction methods and bioinformatic tools such as AntiSMASH, BLAST, Artemis and BioEdit were applied. The growth conditions were investigated on different growth media. Bioactivity of the compounds were examined on disc diffusion assays and with the Kawabata method for enzyme activity.</p> <p>The results of this study show that <i>Nostoc</i> sp. CENA543 produces toxic amounts of nodularin. The novel peptide group was named pseudospumigins. Six variants of pseudospumigins were observed, the main variant being pseudospumigin A. Amino acid sequence of pseudospumigin A is Hpla-D-Hty-L-Ile-Argininal with mass of 612,4 Da. Gene clusters of nodularin and anabaenopeptin match corresponding genes of <i>Nodularia spumigena</i> CCY9414. The biosynthetic genes of pseudospumigin have high resemblance to spumigin genecluster of <i>Nodularia spumigena</i> CCY9414. Change in adenylation domain substrate specificity and deletion of three additional genes would explain the difference between pseudospumigins and spumigins.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Anabaenopeptin, cyanobacteria, nodularin, <i>Nostoc</i> , NRPS, PKS, pseudospumigin,			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Food and Environmental Sciences, the reference library of Microbiology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Master's thesis was supervised by professor Kaarina Sivonen, docent Jouni Jokela, docent David Fewer and Anu Humisto			

Sisällysluettelo

Lyhenteet.....	6
Johdanto.....	7
1. Kirjallisuuskatsaus.....	8
1.1. Syanobakteerit.....	8
1.2. Brazilian Pantanal-kosteikko.....	10
1.3. <i>Nostoc</i> -syanobakteerit.....	10
1.4. Syanobakteerien tuottamat bioaktiiviset yhdisteet	11
1.4.1. Spumigiinit.....	12
1.4.2. Aeruginosiinit.....	13
1.4.3. Pseudoaeruginosiinit.....	14
1.4.4. Nodulariinit	15
1.4.5. Mikrokystiinit.....	16
1.4.6. Anabaenopeptiinit	17
1.4.7. Ei-ribosomaalinen peptidisynteesi ja polyketidisynteesi	19
1.5. Työssä käytetyt menetelmät	22
1.5.1. Nestekromatografia ja massaspektrometria	22
1.5.2. Stereokemiallinen analyysi.....	24
1.5.3. AntiSMASH ja bioinformatiikka.....	25
2. Tutkimuksen tavoitteet	26
3. Aineisto ja menetelmät	26
3.1. Työssä käytetyt bakteerikannat ja kasvatusolosuhteet	26
3.1.1. Työssä käytetyt bakteerikannat.....	26
3.1.2. Kasvatusolosuhteet.....	27
3.1.3. Kasvatus eri suolapitoisuuksissa.....	28
3.2. Työssä käytetyt kemialliset menetelmät	29
3.2.1. Bioaktiivisten peptidien uuttaminen bakteereista.....	29
3.2.2. Peptidien tunnistus LC-MS-menetelmällä	30
3.2.3. Peptidien fraktiointi HPLC:llä.....	31
3.2.4. Aminohappoanalyysi	32
3.2.5. Pseudospumigiinin kvantitointi	34
3.2.6. Nodulariinin kvantitointi	34
3.2.7. Spektrofotometrianalyysi	34
3.2.8. DNA:n eristys	35
3.2.9. Sekvensointi ja sekvenssitiedon kooste (assembly).....	37

3.2.10. NRPS- ja PKS-synteesigeenien etsiminen	37
3.2.11. Fylogenia.....	38
3.3. Bioaktiivisuustestit.....	38
3.3.1. Kiekkodiffuusio maljoilla	38
3.3.2. Trypsiini-inhibitio.....	39
4. Tulokset.....	41
4.1. Morfologia ja kasvu	41
4.2. Pseudospumigiinin ja nodulariinin puhdistus HPLC:llä	44
4.3. Pseudospumigiinin saanto	45
4.4. Nodulariinisanto	46
4.5. Tetrapeptidin rakenteen selvittäminen LC-MS tekniikalla	47
4.6. Pseudospumigiinin UV-spektri	50
4.7. Kantojen seulonta massaspektrometrillä	51
4.8. <i>Nostoc</i> sp. CENA535 -kannan kiekkodiffuusiotesti maljoilla	52
4.9. Pseudospumigiinin trypsiini-inhibitio	53
4.10. Geenien analyysi	57
4.10.1. DNA:n eristyksen tulos	57
4.10.2. Sekvensointi ja sekvenssitiedon kokoaminen.....	59
4.10.3. Löydetyt geenirykelmät	60
4.10.4. Pseudospumigiini	61
4.10.5. Nodulariini	63
4.10.6. Anabaenopeptiinit.....	64
4.10.7. Tuntemattomat geeniryppäät.....	64
4.10.8. <i>Nostoc</i> sp. CENA543 –bakteerin fylogenia	65
5. Tulosten tarkastelu	66
5.1. Pseudospumigiinien biosynteesi ja rakenne	66
5.2. Nodulariinin tuotanto	67
5.3. <i>Nostoc</i> sp. CENA543 muut geenit, evoluutio ja fylogenia	68
5.4. <i>Nostoc</i> sp. CENA543 -kannan morfologia, kasvu ja limantuotanto	69
5.5. Pseudospumigiinin trypsiini-inhibitio	70
6. Kiitokset.....	70
7. Kirjallisuus	71
8. Liitteet.....	85

Lyhenteet

bp	Emäspari (base pair)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum albumin
DNA	Deoksiribonukleinihappo
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High Performance Liquid Chromatography)
IC ₅₀	Konsentraatio, jossa puolet reaktiosta estyy (half maximal Inhibitory concentration)
LC/MS	Nestekromatografia-massaspektrometria (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi (Nuclear Magnetic Resonance)
NRPS	Ei-ribosomaalinen peptidi syntetaasi (NonRibosomal Peptide Synthetase)
Psp	Pseudospumigiini
PKS	Polyketidisyntaasi (PolyKetide Synthase)
sp.	Laji
ssp.	Alalaji
Q-TOF	Quadrupole-time of flight – massaspektrometri
Choi	2-karboksi-6-hydrooktahydroindoli, ei proteinogeeninen amino-happo
Hpla	hydroxyphenyl lactic acid, hydroksifenyylimaitohappo
Hty	Homotyrosiini
Hph	Homofenyyialaniini
Pro	Prolini
mPro	4-metyyliprolini
Arg	Arginiini
Argal	Argininaali
Argol	Argininoli

Johdanto

Syanobakteerit ovat maailman vanhimpia yhteyttäviä eliöitä, joita elää nykyään monenlaisissa elinympäristöissä, merien massakukinnoista kasvisymbiooseihin (Knoll 2008). Syanobakteerit tuottavat erilaisia bioaktiivisia aineita, jotka voivat olla muulle elämälle myrkyllisiä (Sivonen ja Börner 2008). Joitakin näistä aineista esiintyy suuria määriä luonnossa vesistöjen kukintojen yhteydessä, ja joitain vain pieniä määriä solun sisällä, jotka on löydetty massaspektrometrian ja bioinformatiikan menetelmin. Näissä aineissa on myös potentiaalia uusiksi lääkeaineiksi esimerkiksi syöpiä ja sienitulehduksia vastaan (Dittmann ym. 2015, Shishido ym. 2015, Newman & Cragg 2016).

Brasilian Pantanal-kosteikolta on eristetty suuri joukko aikaisemmin kuvailemattomia syanobakteereita, joiden joukosta on löydetty kanta *Nostoc* sp. CENA543 (Andreote ym. 2014, Genuario ym. 2017). Kanta on mielenkiintoinen sen tuottamien bioaktiivisten aineiden ansiosta. *Nostoc* sp. CENA543 – raakauutetta analysoitaessa on todettu sen tuottavan nodulariinia, anabaenopeptiineja ja pseudospumigiineja. Nodulariini on *Nodularia*-suvun bakteereille tyypillinen maksamyrkky ja sen löytäminen *Nostoc* – kannasta on lähes ainutlaatuista (Gehring ym. 2012, Kaasalainen ym. 2012). Pseudospumigiini taas on uusi, tämän tutkimuksen yhteydessä löydetty yhdiste, joka rakenteensa puolesta vaikuttaa proteaasi-inhibiittorilta. Anabaenopeptiinit ovat syklisten heksapeptidien perhe, jotka myös ovat proteaasi-inhibiittoreita.

Työn tarkoituksena oli selvittää *Nostoc* sp. CENA543-kannan pseudospumigiinia tuottavat geenit eli pseudospumigiinin geenirykelmä ja sen toiminta, sekä kasvattaa pseudospumigiinia tuottavaa *Nostoc* sp. CENA543-kantaa, puhdistaa siitä pseudospumigiinia riittävä määrä pseudospumigiinin entsyymi-inhibiitio kokeita ja NMR rakenneanalyysiä varten. Lisäksi tutkittiin muita Pantanal-kosteikolta eristettyjä syanobakteereja, sillä niillä saattaa olla samoja nodulariinin, pseudospumigiinin tai anabaenopeptiinien tuotantoa ohjaavia geenejä kuin *Nostoc* sp. CENA543-kannan bakteereilla. Jos näitä geenejä löydetäisiin muiltakin bakteereilta, voitaisiin tehdä johtopäätöksiä rakenteiden evoluutiosta ja siirtymisestä horisontaalisesti lajilta toiselle.

1. Kirjallisuuskatsaus

1.1. Syanobakteerit

Syanobakteerit, arkikielessä myös sinilevät, ovat yhteyttäviä esitumallisia eliöitä, jotka muodostavat bakteerien sukupuussa oman kaarensa (Waterbury 2006, Castenholz 2015). Syanobakteereista monet kykenevät ilmakehän kaasumaisen typen sitomiseen. Käyttäessään auringon energiaa ja ympäristönsä hiilenlähteitä, kuten hiilidioksidia, ne kykenevät tuottamaan niistä itselleen energiaa ja ympäristöönsä happea. Kehittyessään 3,5 miljardia (Paerl & Paul 2012) - 2,3 miljardia (Knoll 2008) vuotta sitten syanobakteerit olivat maailman ensimmäisiä happea tuottavia fotosynteettisiä eliöitä, jotka ovat suurelta osin vastuussa ilmakehämme muodostumisesta happipitoiseksi. Myöhemmin monien aitotumallisten evoluutio johti yhteyttäviin organismeihin. Näillä on usein soluissaan yhteyttämisestä vastaavia viherhiukkasia. Viherhiukkasten evoluutiosta vallitsee käsitys, jonka mukaan eukaryoottisolun sisälle kulkeutunut syanobakteeri on muodostanut symbioosin isäntäsolun kanssa, ja jäänyt soluihin soluelimeksi (Gould ym. 2017). Viherhiukkasilla on vieläkin muista eliön raketeista poikkeava perimä. Yhteyttämis- ja typensidontakykynsä vuoksi syanobakteerit ovat yhä tärkeä osa aineiden kiertoa biosfäärissä.

Syanobakteerit elävät monenlaisissa ympäristöissä: makeissa ja suolaisissa vesistöissä, hyvin äärimmäisissä suolapitoisuuksissa ja lämpötiloissa, maalla kasvien ja kivien pinnoilla sekä monien kasvien symbiontteina (Waterbury 2006, Castenholz 2015). Symbiooseja syanobakteerit muodostavat esimerkiksi jäkälien ja käpypalmujen kanssa, tarjoten jäkälille ja käpypalmuille ilmasta sitomaansa typpeä (Bergman ym. 2008). Erityisen tunnettuja ovat bakteerien massasiintymät kesäisin murtovesissä ja makeissa vesissä esimerkiksi Itämerellä, Australiassa, ja Etelä-Amerikassa (Codd ym. 2005, Paerl & Paul 2012). Nämä kukinnat ovat tulleet tunnetuiksi erityisesti niiden myrkyllisyyden takia.

Monet syanobakteerit tuottavat erilaisia ihmisille ja muille eliöille myrkyllisiä aineita (Codd ym. 2005, Sivonen 2009). Myrkkujen tiedetään johtaneen usein ihmisten ja kotieläinten kuolemiin (Jochimsen ym. 1998, Carmichael ym. 2001).

Myrkyt vaikuttavat maksaan tai hermostoon, aiheuttaen toimintahäiriöitä, kudostuhoa, solujen tuhoutumista ja solukuolemaa maksassa, ruuansulatuselimistössä ja iholla, sekä neurologisia häiriöitä. Maksamyrkyt eli hepatotoksiinit voivat suurissa määrissä olla ihmiselle tappavia. Syanobakteerien bioaktiivisilla aineilla on usein spesifejä aktiivisuuksia esimerkiksi entsyymien inhibiittoreina, mikä tekee niistä potentiaalisen lähteen uusien lääkeaineiden kehittämiseen (Dittmann ym. 2015). Varsinaista syytä näiden sekundaarimetaboliittien tuottamiseen ei tarkasti tiedetä. Niiden merkitys bakteereille liittyy luultavasti suojautumiseen saalistajilta ja kilpailuun muiden organismien kanssa, solujen väliseen signalointiin tai hivenaineiden sitomiseen (Sivonen 2009). Näiden tuotettujen yhdisteiden massa voi olla jopa yli 1 % solun kuivapainosta (Lehtimäki ym. 1997). Aineiden tuottaminen on siis merkittävä kuormitus soluille. Jos niillä ei olisi mitään funktiota solujen elämässä, olisi evoluutio jo poistanut ne eliöiden elämästä tarpeettomina rasitteina.

Lisääntyneet yhdyskuntajätevedet ja lannoitteiden käyttö aiheuttavat vesistöissä huomattavasti runsastuneen ravinnekuormituksen, etupäässä fosfori- ja typpikuorman. Ravinteiden kerääntyminen on suotuisaa syanobakteerien kukinnoille ja on johtanut niiden ja muiden eliöiden kiihtyneeseen kasvuun ja vesistön rehevöitymiseen (Paerl & Paul 2012). Fosfori on yleensä rajoittava tekijä syanobakteerien kasvuille, niiden fotoautotrofisuuden ja typensidontakyvyn ansiosta. Ilmaston lämpeneminen vaikuttaa ympäristöön, kiihdyttäen syanobakteerien aineenvaihduntaa, kasvunopeutta ja kukintojen muodostumista (O'Neil ym. 2012). Lämpötilan nousu on merkittävä kilpailuetu syanobakteereille ekosysteemissä, jossa eukaryoottien, kuten erilaisten levien kasvu hiipuu lämpötilan noustessa, prokaryoottien kasvun nopeutuessa.

Syanobakteereilla tiedetään esiintyvän horisontaalista geenien siirtymistä (Flores ym 2008). Kasvattamalla bakteereja alustalla, jossa on vapaana olevaa DNA:ta, bakteerit saattavat transformaation kautta ottaa DNA:ta ympäristöstä perimäänsä. Syanobakteerit myös harjoittavat konjugaatiota toistensa ja muiden kaarien bakteerien kanssa, joilla on oikeat siirtämisen aktivoivat geenit (Cohen & Gurevitz 2006). Myös syanobakteereja infektoivia faageja eli syanofaageja

tunnetaan (Coloma ym. 2017). Ne saattavat transduktion kautta siirtää geenejä bakteerilta toiselle.

1.2. Brazilian Pantanal-kosteikko

Brasiliassa sijaitsee Pantanal-kosteikkoalue, joka on maailman suurin manto-reella sijaitseva kosteikko. Alueella on useita erillisiä osia, joissa vallitseva erilaiset olosuhteet. Nhecolândia-nimisessä kosteikon osassa on useita emäksisiä suolajärviä (Andreote ym. 2014). Järvien emäksisyys voi nousta jopa pH arvoon 8,9 - 10,5, epäorgaanisten ionien konsentraatio $2,5 \text{ g l}^{-1}$ – 50 g l^{-1} ja sähkönjohtavuus 3 mS cm^{-1} - 70 mS cm^{-1} . Äärimmäiset olosuhteet vallitsevat kuivan kauden aikana, jolloin järvien vedenpinta laskee, tai ne saattavat jopa kuivua kokonaan. Nämä järvet ovat suolaisuutensa ja emäksisyytensä vuoksi äärimmäisiä ympäristöjä elämälle. Monet syanobakteerit kuitenkin elävät näissä järvissä. Syanobakteerit ja levät kukkivat järvissä jopa vuoden ympäri, riippuen sademäärästä. Järvien olosuhteet johtuvat niihin kerääntyneistä kemikaaleista, veden haihtuessa järvestä.

1.3. *Nostoc*-syanobakteerit

Nostoc on syanobakteerien kaareen, *Nostocales* –lahkoon, *Nostocaceae* – heimon kuuluva suku (Herdman ym. 2015). Työssä käytetyt bakteerikannat on tunnistettu vain sukutasolle 16S rRNA:n avulla lajitason sijaan syanobakteerien vakiintumattoman taksonomian vuoksi ja koska DNA:n eristäminen lajin määrittämiseksi on usein hankalaa. *Nostoc* -suvun bakteerit kasvavat rihmoina ja niillä on tyypillisesti tyypeä sitovia heterokystejä, lyhyinä soluketjuina trikomeista irtoavia liikkuvia hormogonioita ja akineetteja eli leposoluja, jotka muodostuvat rihmaan heterokystien välille. *Nostoc* –suvun bakteerit ovat yleisimpiä symbiontteja maaekosysteemeissä muiden eliöiden kanssa, muodostaen symbiooseja esimerkiksi sammaleiden, sienien (jäkälät) (Kaasalainen ym. 2012) ja käpypalmujen (Gehring ym. 2012) kanssa. *Nostoc* on pisimmälle kehittyneitä sukuja, jolla voi olla erilaisia soluja eri käyttötarkoituksiin. Ne kasvavat myös benttisinä

makeissa vesistöissä ja maaperässä, esimerkiksi paksuina mattoina napa-alueilla (Herdman ym. 2015).

Nostoc-suvulle tyypillisiä ominaisuuksia ovat heterokystien ja hormogonioiden muodostaminen (Herdman ym. 2015). Heterokystit ovat erikoistuneita soluja, joiden tehtävänä on sitoa kaasumaista typpeä. Typen sitominen eristetään omiin erillisiin soluihinsa, jottei yhteyttämisessä syntyvä happi estäisi prosessissa tarvittavan nitrogenaasi-entsyymien toimintaa. Hormogoniat ovat lyhyitä liikkuvia rihmoja, joiden avulla *Nostoc*-kasvusto levittäytyy uusille alueille. Heterokystit sijoittuvat rihmoissa tyypillisesti hormogonioista muodostuneiden nuorten trikomien päihin. Uusissa hormogonioissa ei ole heterokystejä. Hormogonian vanhentuessa solut kasvavat ja heterokystejä muodostuu rihmaan interkalaarisesti, eli rihman keskellä olevat solut erikoistuvat rihman vanhetessa. Rihma kasvaa pituutta päistään solujen jakaantuessa. Solujen välissä olevat vanhat heterokystit rappeutuvat ja hajoavat, jolloin rihmasta irtoaa uusia hormogonioita. *Nostoc*-bakteerien isäntäkasvit vapauttavat kemikaaleja, jotka voivat edistää kasvin infektoitumista bakteereilla. Kemikaalit laukaisevat hormogonioiden muodostumisen ja toimivat houkuttimina, jolloin ne pääsevät liikkumaan ja mahdollisesti saavuttavat isännän, jolloin symbionttinen suhde mahdollistuu.

Solujen vanhetessa rihmaan muodostuu myös akineetteja, jotka ovat solujen kestäviä lepomuotoja (Herdman ym. 2015). Akineetit muodostuvat rihmoihin kahden heterokystin väliin, yhtä pitkän matkan päähän molemmista heterokysteistä. Vanhoissa kasvustoissa akineetteja muodostuu ketjussa useampia, ja suurin osa vanhan viljelmän soluista voikin olla akineetteja.

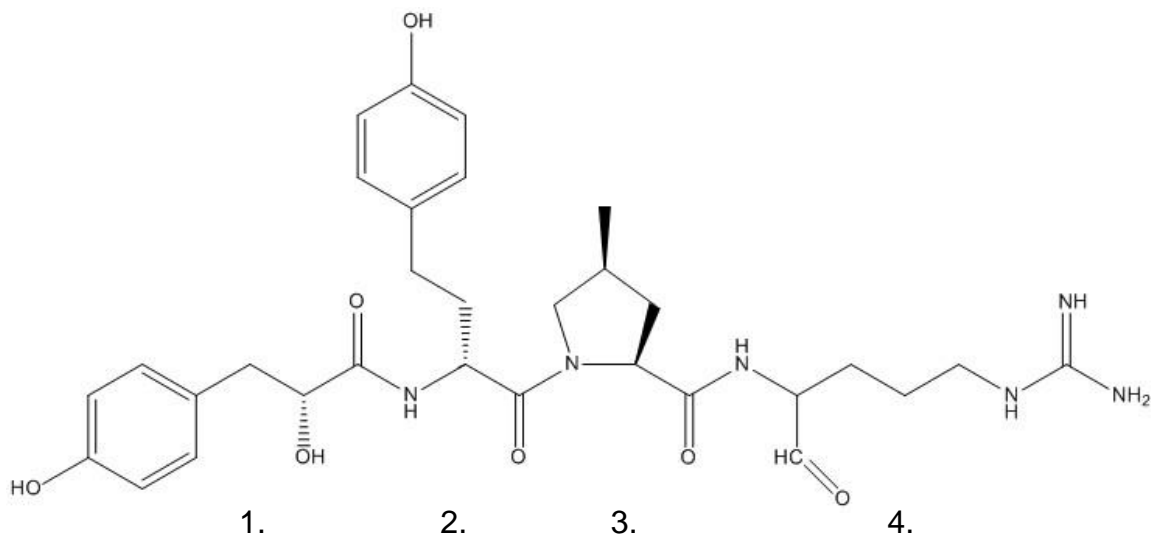
1.4. Syanobakteerien tuottamat bioaktiiviset yhdisteet

Syanobakteerien tuottamista monista yhdisteistä tässä työssä keskitytään maksa- ja myrky- nodulariineihin ja mikrokystiineihin, uuteen pseudospumigiini-peptidiryhmään ja muihin niitä kemiallisesti muistuttaviin yhdisteisiin, sekä anaerobnopeptiineihin. Kaikki työssä käsiteltävät yhdisteet tuotetaan soluissa ei-ribosomaalisen peptidisynteesin tai polyketidisynteesin kautta, joista kerrotaan lisää luvussa 1.4.8 (Welker & von Döhren 2006).

Syanobakteerit tuottavat monia bioaktiivisia aineita, joita on tutkittu hyödyllisten yhdisteiden löytämiseksi (Dittmann ym. 2015). Monilla syanobakteerien bioaktiivisista aineista on sienien, bakteerien ja syöpäsolujen kasvua estävä vaikutus (Humisto ym. 2015, Shishido ym. 2017). Syanobakteerit ovat erityisen rikas bioaktiivisten sekundaarimetaboliittien lähde, joita löydetään jatkuvasti lisää ja joiden kemiallisia rakenteita ja biosynteesigeenejä opitaan tuntemaan laajemmin.

1.4.1. Spumigiinit

Spumigiinit ovat alun perin Itämeren *Nodularia spumigena* AV1 -bakteerikannasta löydetty peptidiryhmä (Fujii ym. 1997A), jotka on myös nimetty tämän lajin mukaan. Spumigiinit ovat seriiniproteaasientsyymien inhibiittoreita, jotka tuotetaan NRPS-PKS –reitit kautta. Tämän reitin geenirykelmä on kuvattu kahdesta Itämeren kannasta: *Nodularia spumigena* AV1 and CCY9414 (Fewer ym. 2009, Voß ym. 2013).



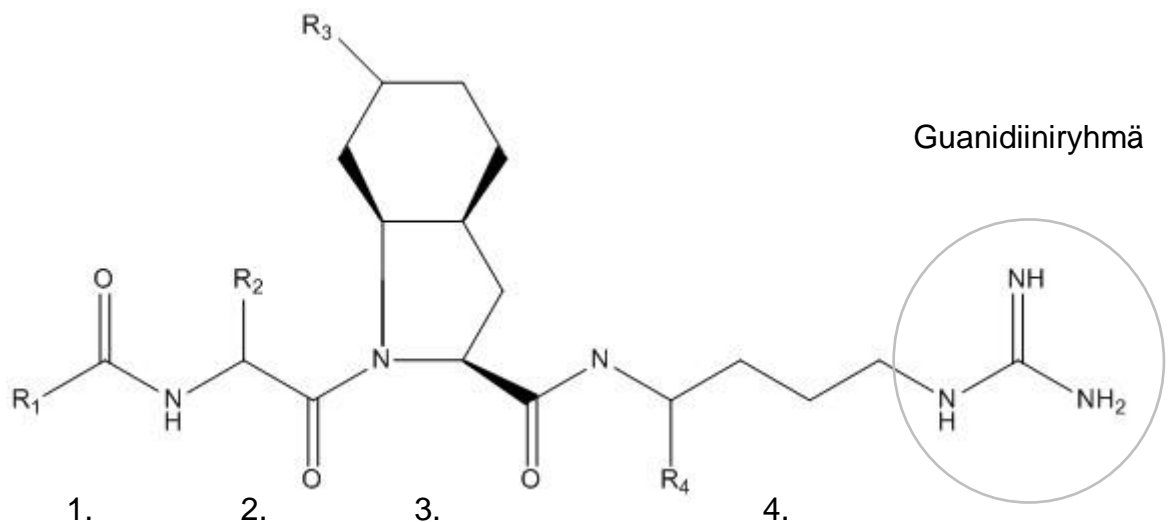
Kuva 1. Spumigiini E:n kemiallinen rakenne.

Tuotantoon osallistuu kaksi NRPS/PKS-geeniä ja neljä näiden apuna toimivaa proteiinia, jotka osallistuvat biosynteesiin tuottamalla metyyliproliinia ja ABC-kul-

jettaja (Fewer ym. 2009). *Nodularia spumigena* AV1 –kannasta löydettyjen spumigiinien alayksikköjen järjestys on: 1. Hpla 2. Hty/Hph 3. Pro/mPro 4. Arg/Argal/Argol (Kuva 1).

1.4.2. Aeruginosiinit

Aeruginosiinit ovat tyypillisesti *Microcystis*- ja *Planktothrix*-sukujen tuottamia neljän alayksikön muodostamia lineaarisia oligopeptidejä. Aeruginosiinit on nimetty *Microcystis aeruginosa* -bakteerin mukaan, josta yhdiste on ensimmäisenä löydetty (Murakami ym. 1994).



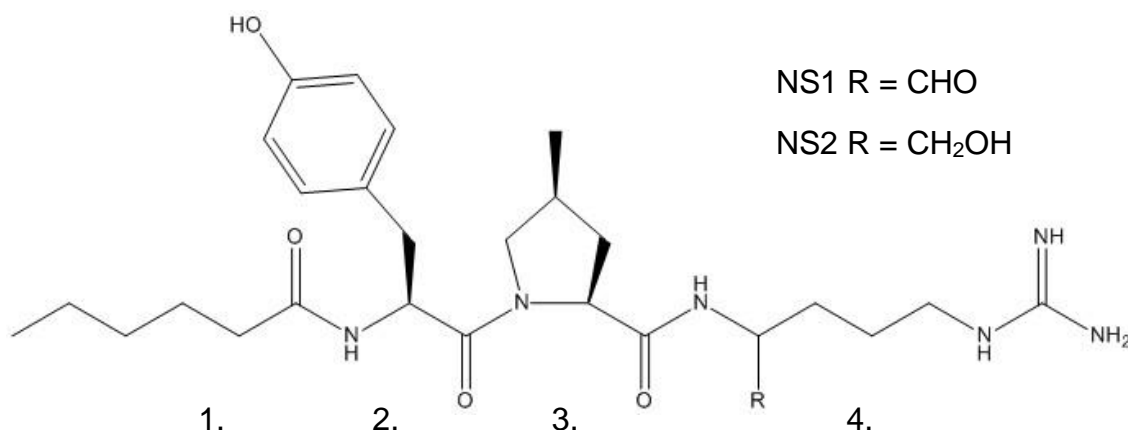
Kuva 2. Aeruginosiinin yleisrakenne, jossa R_{1-4} edustavat vaihtelevia rakenteita.

Aeruginosiini tuotetaan ei-ribosomaalisesti, ja sille on ominaista epätavallinen Choi (2-karboksi-6-hydroksioktahydroindoli) -aminohappo 3 asemassa. Aeruginosiinia tuottavien *aer*-geenien uskotaan periytyvän yhdestä esi-isästä, ja kehittyneen nykyisiin variaatioihin pitkälti horisontaalisen geenin siirron seurauksena. Useimmat aeruginosiinit ovat voimakkaita seriiniproteaasi-inhibiittoreita. Geenirykelmän erilaistumisien myötä *Nodularia spumigena* –kannoista on löydetty 11 erilaista aeruginosiinivarianttia (Fewer ym. 2013) ja mahdollisuus yli

500 potentiaalisen variaation olemassaoloon on ennustettu (Welker & von Döhren 2006). Aeruginosiinin tyypillinen rakenne (Kuva 2): 1. Hpla/Pla/Hex 2. vaihtelevia hydrofobisia aminohappoja Leu/Ile/Phe/Tyr/Hty 3. Choi 4. Guanidii-ryhmän sisältävä aminohappojohdannainen (Ersmark ym. 2007, Ishida ym. 2009, Lifshits & Carmieli 2012, Dailler ym. 2015).

1.4.3. Pseudoaeruginosiinit

Pseudoaeruginosiinit ovat *Microcystis aeruginosa* ja *Nodularia spumigena* –bakteerien tuottamia peptidejä (Lifshits & Carmeli 2012), joiden biosynteesi tapahtuu todennäköisimmin aeruginosiini- ja spumigiinireittien yhteistyönä *Nodularia spumigena* –bakteerin tapauksessa (Liu ym. 2015).



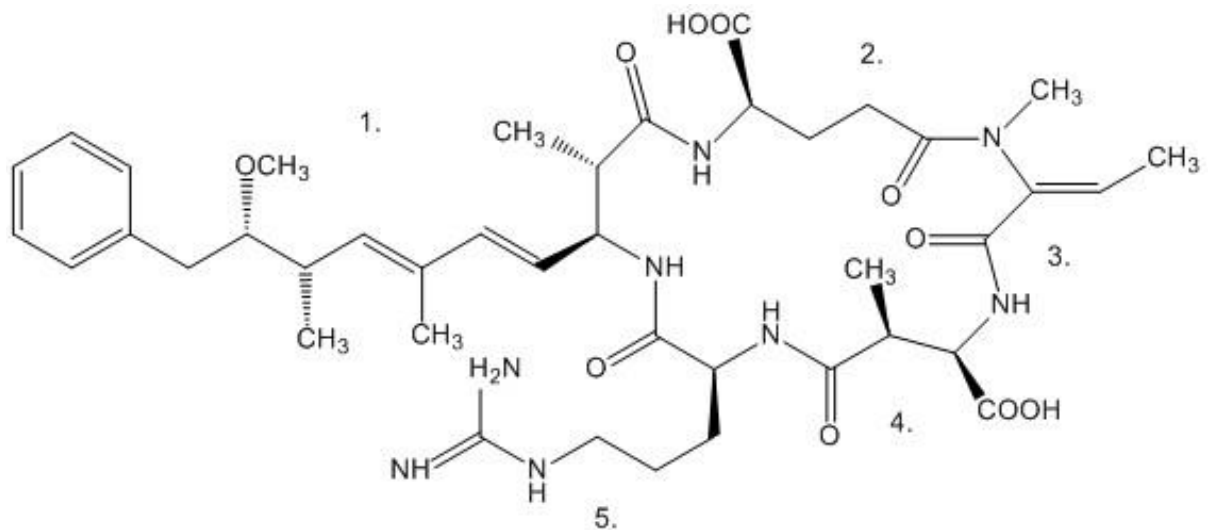
Kuva 3. Pseudoaeruginosiinien NS1 ja NS2 kemialliset rakenteet.

Pseudoaeruginosiineja on kuvailtu kirjallisuudessa kolme varianttia. Pseudoaeruginosiini KT554:n aminohappojärjestys on D-Hpla-D-Leu-L-Phe-Agmatiniini (m/z 555.3280) (Lifshits & Carmeli 2012). Pseudoaeruginosiini NS1:n aminohappojärjestys on heksaanihappo-Tyr-mPro-Argininaali (m/z 531) ja pseudoaeruginosiini NS2:n aminohappojärjestys on heksaanihappo-Tyr-mPro-Arginoli (m/z 533) (Liu ym. 2015). Pseudoaeruginosiinit NS1 ja NS2 (Kuva 3) ovat

aeruginosiinisynteesin sivutuote. Aeruginosiinia tuottavan entsyymin 3. adenyylaatiomoduli tunnistaakin substraatikseen Choi-aminohapon sijaan metyyliproliinin, jolloin aeruginosiinin sijaan syntyy pseudoaeruginosiinia. Metyyliproliinin ovat valmistaneet samassa solussa toimivan spumigiinin synteesireitin entsyymit L-leusiinista. Pseudoaeruginosiinit NS1 ja NS2 toimivat seriiniproteaasi-inhibiittorina aeruginosiinin ja spumigiinin tapaan (Liu ym. 2015).

1.4.4. Nodulariinit

Nodulariinit ovat maksamyrkkyjä, jotka yleensä mielletään pelkästään *Nodularia*-suvun bakteerien tuottamiksi peptideiksi (Reinhart ym. 1988, Sivonen ym. 1989, Moffitt & Neilan 2004, Gehringer ym. 2012).



Kuva 4: Nodulariini-R:n kemiallinen rakenne.

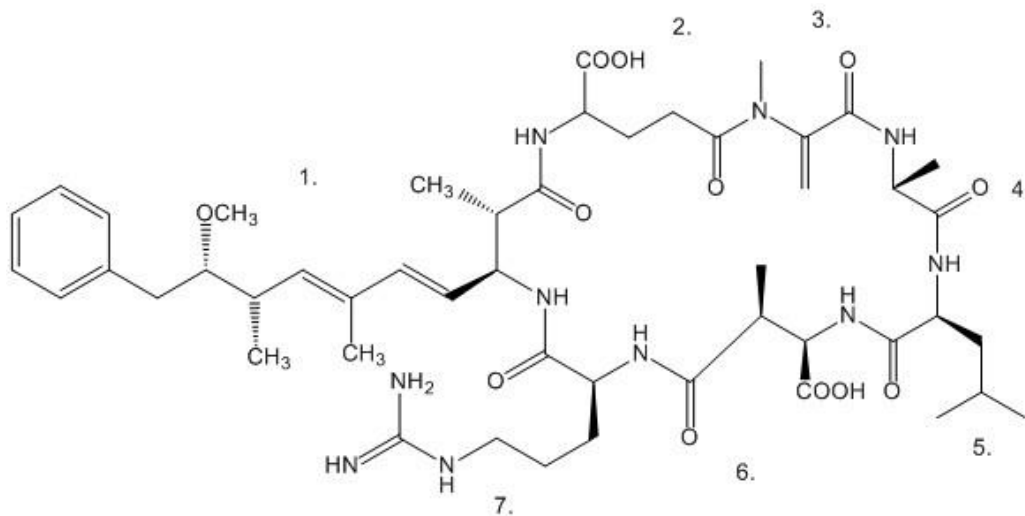
Pitkään aikaan ei tiedetty muiden kuin *Nodularia*-suvun bakteerien tuottavan nodulariinia, ja sen tuotantoa on jopa ehdotettu merkkiaineeksi *Nodularia spumigena*-bakteerin läsnäolosta (Moffitt & Neilan 2004). Pieniä määriä nodulariinia tuottavia *Nostoc*-suvun kantoja on kuitenkin löydetty. Tällaisia ovat Käpy-

palmujen (*Macrozamia* sp.) kanssa symbioosissa elävät *Nostoc* sp. 'Macrozamia riedlei 65.1' ja *Nostoc* sp. 'Macrozamia serpentina 73.1' (Gehring ym. 2012), röyhelösammaleen (*Blasia pusilla* L.) kanssa symbioosissa elävät kannat (Liamer ym. 2016) ja jäkälien syanobakteeriosakkaat (Kaasalainen ym. 2012). Nodulariinia tuottavia bakteereja esiintyy suurina massaesiintyminä esimerkiksi Itämeressä (Sivonen ym. 1989, Mazur-Marzec ym. 2006), Australian rannikko-alueilla ja suolajärvissä USA:ssa (Lehtimäki 2000). Nodulariini-R (Kuva 4) aminohapposekvenssi on 1. Adda ((2S,3S,8S,9S)-3-amino- 9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4(E),6(E)-dienoic acid) 2. D-Glu 3. Mdhb (*N*-methyldehydrobutyrine) 4. D-MeAsp (D-erythro- β -methylaspartic acid) 5. Arg (Reinhart ym. 1988) ja protonoidun molekyylin m/z arvo on 825,6 (Karlsson ym. 2003).

Nodulariinin myrkyllisyys perustuu fosfataasientsyymi-inhibitiioon maksassa (Chen ym. 2013). Elimistön sappihappojen kuljetusjärjestelmän epäspesifinen kuljettajaproteiini vie nodulariinin maksaan, jossa nodulariini estää fosfataasien toiminnan. Fosfataasien toiminnan estyessä solun tukirangan fosforylaation lisääntyy. Tämä hyperfosforylaatio johtaa solun tukirangan proteiinien uudelleenjärjestelyyn, jolloin solun tukiranka romahtaa. Seurauksena on maksansisäinen verenvuoto, maksan vajaatoiminta ja kuolema.

1.4.5. Mikrokystiinit

Mikrokystiinit ovat *Microcystis* –suvun bakteereista löydettyjä maksamyrkkijä (Sivonen 2009). Mikrokystiiniä on löydetty myös *Planktothrix* (Bruno ym. 1992), *Oscillatoria* (Luukkainen ym. 1993), *Anabaena* (Sivonen ym. 1992) ja *Nostoc* –sukujen bakteereista (Sivonen ym. 1990, Oksanen ym. 2004). Nodulariini ja mikrokystiini ovat rakenteeltaan hyvin samanlaiset. Mikrokystiini LR:n aminohapposekvenssi on 1. Adda 2. D-Glu 3. Mdha 4. D-Ala 5. L-Leu 6. D-MeAsp 7. Arg (Kuva 5). Nodulariinin aminohapposekvenssi on kaksi aminohappoa lyhempi, mikrokystiinin 6. D-Ala ja 7. L-Leu puuttuvat nodulariinilta.



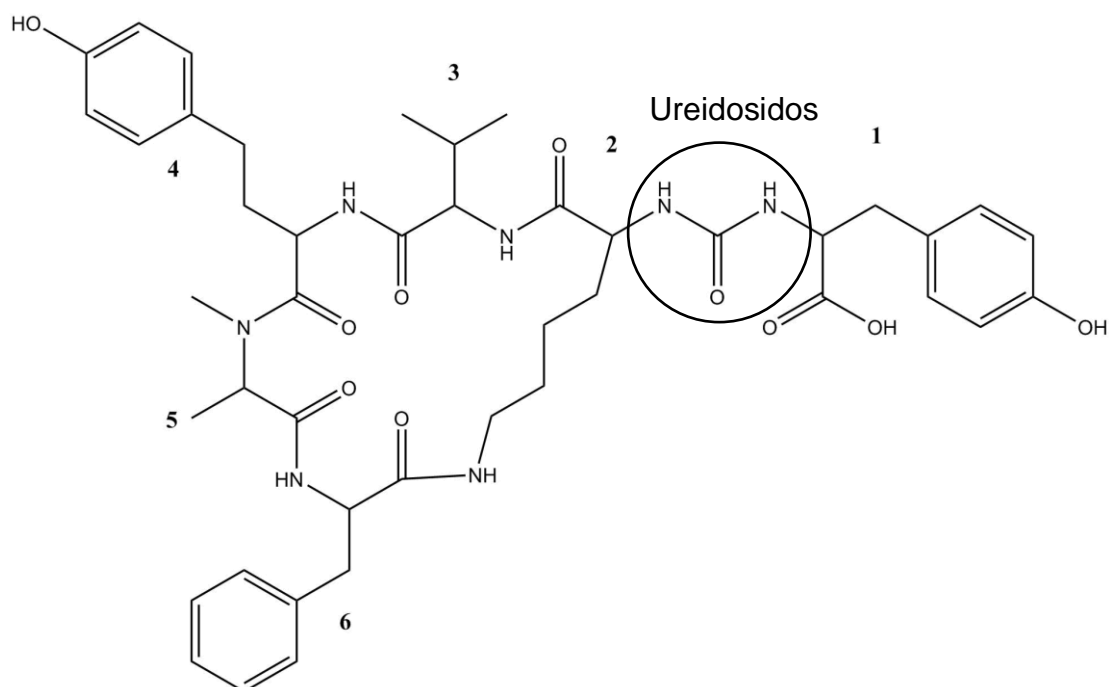
Kuva 5. Mikrokystiini-LR:n kemiallinen rakenne.

Mikrokystiini käyttäytyy hyvin samoin kuin nodulariini, ja niiden maksamyrkyllisyys on samalla tasolla (Dawson 1998, Pearson ym. 2010). Niiden geenirykelmät ovat myös samanlaiset, lukuunottamatta kahden geenin puuttumista nodulariinin rykelmästä, joka selittää puuttuvat aminohapot molekyylin rakenteesta. Nodulariini on todennäköisesti kehittynyt mikrokystiinistä kyseisten geenien deleetion kautta. (Rantala ym. 2003, Moffitt & Neilan 2004) Mikrokystiiniä tuottavat syanobakteerit kuten *Microcystis* spp. kasvavat tyypillisesti makeissa vesissä. Mikrokystiiniä tuottavia *Anabaena* spp. bakteereja on löydetty myös Itämerestä, joka on murtovettä (Halinen ym. 2007).

1.4.6. Anabaenopeptiinit

Anabaenopeptiinit ovat alun perin *Anabaena* –suvun bakteereista löydetty peptidiryhmä (Harada ym. 1995, Rouhiainen ym. 2010). *Anabaena* -bakteerien lisäksi myös *Oscillatoria*, *Nodularia*-, ja *Microcystis*-, *Lyngbya*-, *Aphanizomenon*-, *Tychonema*-, *Schizothrix*-, *Nostoc*-, *Desmonostoc*- ja *Brasilionema* -sukujen bakteereista on löydetty anabaenopeptiinejä (Spoof ym. 2015). Yhdistettä on löytynyt myös *Theonella* –suvun pesusienistä, joihin sen uskotaan päätyneen syanobakteerien tuottamana. Yhdisteitä tuottavat siis makean, suolaisen, ja

murtoveden syanobakteerit, sekä maalla ja kasvien symbiontteina elävät bakteerit (Welker & von Döhren. 2006).



Kuva 6. Anabaenopeptiini A:n kemiallinen rakenne.

Yhteensä erilaisia variantteja on löydetty kaikkiaan 119 (Shishido ym. 2017). Anabaenopeptiinit (Kuva 6) ovat viiden aminohapon muodostamia syklisiä peptidejä, joihin on ureidosidoksella kiinnittynyt kuudes aminohappo. Kuvassa 6 on esitetty Anabaenopeptiini A, jonka aminohappojärjestys on 1. Tyr 2. Lys 3. Val 4. Hty 5. *MAla* 6. Phe (Harada ym. 1995). Anabaenopeptiinien toinen aminohappo on aina D-lysiini, kaikki muut vaihtelevat variantin mukaan. 5. aminohappo on aina N-metyloitunut (Christiansen ym. 2011).

Anabaenopeptiinien nimeämisessä on ollut kirjavia käytäntöjä lukuisten varianttien löytyessä eri bakteerisukujen tuottamana. Osaa *Nodularia*-bakteerien tuottamista anabaenopeptiineistä kutsutaan nodulapeptiineiksi, *Oscillatoria*-bakteerien tuottamia oskillamideiksi, *Lyngbya*-bakteerien tuottamia lyngbyaureidamideiksi ja *Nostoc*-bakteerien tuottamia nostamideiksi. Anabaenopeptiini-

neista on havaittu monenlaisia bioaktiivisuuksia, muun muassa karboksipeptidaasi A:n inhibitio, proteiinifosfataasi 1:n inhibitio, kymotrypsiini-inhibitio, elastaasi-inhibitio, trypsiini-inhibitio ja trombiini-inhibitio (Spoof ym. 2015). Bioaktiivisuudet ovat varianttikohtaisia, eikä kaikista varianteista ole havaittu minkäänlaista bioaktiivisuutta.

1.4.7. Ei-ribosomaalinen peptidisynteesi ja polyketidisynteesi

Monet syanobakteerien bioaktiiviset aineet kuten spumigiinit (Fewer ym. 2009), mikrokystiinit (Tillett ym. 2000, Rouhiainen ym. 2004), aeruginosiinit (Ishida ym. 2009, Fewer ym. 2013), anabaenopeptiinit (Rouhiainen ym. 2010), nodulariinit (Moffitt & Neilan 2004), hassallidiinit (Neuhof ym. 2005, Vestola ym. 2014) ja pseudoaeruginosiinit (Liu ym. 2015) on tuotettu ei-ribosomaalisessa peptidisynteesissä. Ei-ribosomaalinen peptidisynteesi tapahtuu ribosomaalisesti tuotettujen ei-ribosomaalisten peptidisyntetaasi (NRPS) ja polyketidisyntaasi (PKS) entsyymien toimesta. NRPS- ja PKS-molekyylit ovat suuria entsyymikomplekseja, joiden tehtävä on liittää aminohappoja ja asetyyli/malonyyliryhmiä toisiinsa sekundaarimetaboliittien tuottamiseksi. Syanobakteerien genomeista noin 5 % muodostuu NRPS- ja PKS-entsyymejä koodaavista geeneistä, ja niillä on keskimäärin noin 5 NRPS tai PKS geenirykelmää genomia kohden (Calteau ym. 2014, Wang ym. 2014).

Suurimman kirjon erilaisia yhdisteitä tuottavat *Lyngbya*-, *Nostoc*-, *Microcystis*- ja *Hapalosiphon*-sukujen bakteerit (Dittmann ym. 2015). Tunnetuimpia NRPS-yhdisteiden syanobakteerituottajia ovat *Nodularia spumigena* ja *Microcystis aeruginosa*, jotka tuottavat suuria määriä toksisia yhdisteitä, ja joista monet yhdisteistä on ensimmäistä kertaa löydetty ja kuvattu, kuten nodulariini ja mikrokystiini. Myös *Anabaena* -suvun bakteereilta tunnetaan paljon kyseisiä peptidejä. Näihin lajeihin kohdistuu vielä paljon tutkimusta ja uusia variantteja yhdisteistä löydetään. Myös yhdisteiden biosynteesigeeneistä löydetään uusia muunnoksia. Nodulariininakin uskotaan kehittyneen deleetiosta mikrokystiinin

geenirykelmässä (Rantala ym. 2003, Moffitt & Neilan 2004). Tunnetuista syanobakteerien genomeista on löydetty useita NRPS-geenejä, joiden tuottamat yhdisteet ovat vielä tuntemattomia (Shih ym. 2013, Wang ym. 2014)

NRPS-entsyymit ovat useista moduuleista koostuvia megaentsyymejä (Finking & Marahiel 2004). Yksi moduuli vastaa peptidisynteesissä yhden aminohapon liittämistä peptidiin. Moduuli koostuu useista domeeneista, jotka tekevät osansa peptidisidoksen muodostamisessa. Kaikissa moduuleissa on adenylaatio, tiolaatio ja kondensaatio domeenit. Adenylaati domeeni (adenylation A) aktivoi aminohapon, jonka tiolaatiomoduulit (thiolation T, tai peptidyl carrier protein PCP) sitovat kiinni moduuliin, jonka jälkeen kondensaati domeeni (condensation C) liittää edelliseen moduuliin liittyneen peptidin oman moduulinsa aminohappoon. Muita domeeneja ovat esimerkiksi metylaatio (methylation M)-, tioesteri (thioesterase TE) - ja epimeraasidomeenit (epimerase E), jotka lisäävät aminohappoon metyyliryhmän tai syklistoivat tuotetun molekyylin tai muuttaa aminohapon L-muodosta D-muotoon. Ei-ribosomaaliseen peptidisynteesiin osallistuu rakennusaineena yleisesti myös ei-proteinogeenisiä aminohappoja. Näitä aminohappoja tuottavat entsyymit on koodattu usein samaan geenirykelmään NRPS-geenien kanssa. NRPS klustereihin sisältyy myös erityisiä aminohappojen muokkausentsyymeitä, jotka vastaavat näiden erikoisten aminohappojen tuottamisesta muokkaamalla yleisesti esiintyviä aminohappoja. Tuotetut peptidit ovat tyypillisesti lyhyitä, alle 20 aminohappoa pitkiä peptidejä, jotka ovat usein rengasrakenteisia ja sisältävät monia aminohappoihin liitettyjä funktionaalisia ryhmiä (Marahiel ym. 1997).

Geeniklustereihin kuuluu usein myös ABC-kuljettaja, jonka toiminnallista tarkoitusta ei varmasti tiedetä (Finking & Marahiel 2004). Kuljettajan tarkoitus voisi hypoteettisesti olla valmiiden peptidien siirto solun ulkopuolelle, mutta tyypillisesti peptidit tuotetaan solujen sisään, eikä eritetä sen ulkopuolelle. Geenirykelmien löytämiseksi on kehitetty erityisiä bioinformatiivisia menetelmiä, jotka perustuvat NRPS-geenien samankaltaisuuteen. (Cane & Walsh 1999, Marahiel ym. 1997).

Adenylaatiidomeeneissa on oikean substraatin tunnistava tasku, joka vastaa oikean aminohapon liittämistä tuotteeseen (Stachelhaus ym. 1999). Taskun toiminta perustuu 10 aminohappotähteen sarjaan, joka tunnistaa oikean substraatin, jolloin entsyymi aktivoi aminohapon liitettäväksi tuotteeseen. Adenylaatiidomeenien substraatin tunnistustarkkuus vaihtelee, jolloin matalan tunnistustarkkuuden tapauksessa entsyymiin sitoutuu eri aminohappo(ja), kuin minkä adenylaatiidomeeni pääosin tunnistaa. Tämän vuoksi useista ei-ribosomaalisesti tuotetuista molekyyleista esiintyy myös eniten tuotetusta molekyylistä aminohappokoostumukseltaan poikkeavia muotoja. Molekyyleilla on modifikaatioita myös niihin liittyneissä karboksyylihapoissa, esimerkiksi lisättyä hydroksyyli-, metyyli- ja asetaattiryhmiä.

Polyketidisyntaasien toiminnassa on samankaltaisuutta NRPS-entsyymien toiminnan kanssa (Cane & Walsh 1999). PKS-entsyymit muodostavat yhdisteitä käyttäen aminohappojen sijaan asyyli-koentsyymi A –monomeerejä, jotka ne yhdistävät ketjuiksi, muodostaen polyketidejä. Polyketidisyntaasi toimii moduuleittain, kuten ei-ribosomaalinen proteiinisynteesi, yhden moduulin pidentäessä polyketidiä aina yhdellä asyyli-ryhmällä. PKS-biosynteesin aloittaa aloitusmoduuli, jossa on asyyli-TRANSFERAASI (acyl transferase, AT) ja asyylikantajaproteiini (acyl carrier protein, ACP). AT katalysoi malonyylin tai asetyylin kondensoitumisen ACP:lle. Seuraavassa moduulissa on ainakin ketoasyyli-syntaasi- (ketoacyl synthase, KS), asyyli-TRANSFERAASI- ja asyylikantajadomeenit. Uuden moduulin AT-domeeni lastaa moduulinsa ACP-domeeniin seuraavaksi polyketidiin liitettävän asyyli-ryhmän. Edellisen moduulin ACP-domeeni siirtää kantamansa asyylin/ketidin uudelle KS-domeenille ja siirtynyt substraatti reagoi ACP-domeeniin kiinnittyneen asyyli-koentsyymi A:n kanssa jättäen KS-domeenin ja pidentyen siirtymällä ACP-domeeniin kiinnittyneeseen asyyliin. Moduuleita voi olla useita peräkkäin, ja pidentyvä polyketidiketju siirtyy aina edelliseltä moduulilta seuraavalle, kunnes viimeisessä moduulissa tioesterasidomeeni (thioesterase, TE) hydrolysoi valmiin polyketidin irti moduulinsa ACP-domeenista. Moduuleissa esiintyy myös muita muuntelevia domeeneja, kuten ketoreduktaasi- (ketoreductase, KR) ja dehydrataasidomeeneja (dehydratase, DH) (Bachmann & Ravel 2009).

Suuri osa NRPS ja PKS entsyymeistä toimii molempia entsyymejä sisältävissä klustereissa, joissa osa molekyylistä syntetisoidaan NRPS entsyymeillä ja osa PKS entsyymeillä (Finking & Marahiel 2004). NRPS ja PKS geenejä on löydetty kaikista kolmesta eliökunnan domeenista genomidataa louhittaessa. Yleisimpiä tuottajia ovat bakteerit: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* ja *Cyanobacteria* –kaarien edustajat. Sienistä *Ascomycota* –kaaren edustajat tuottavat paljon näitä yhdisteitä. Arkeoneista on löydetty vain muutamia NRPS/PKS geenejä (Wang ym. 2014).

1.5. Työssä käytetyt menetelmät

1.5.1. Nestekromatografia ja massaspektrometria

Yksi oleellinen osa tätä työtä oli tutkittavien yhdisteiden puhdistaminen bakteereista. Tämä tehtiin nestekromatografian (LC, liquid chromatography) avulla käänteisfaasimenetelmällä. Kromatografiassa tutkittava aine tai seos liuotetaan ajoliuokseen- tai kaasuun, ja ajetaan toisen ainefaasin läpi (Jaarinen & Niiranen 2008). Näytteen sisältämät yhdisteet kulkeutuvat faasin läpi eri nopeudella niiden kemiallisten ominaisuuksien perusteella, esimerkiksi poolisemmat yhdisteet voivat kulkeutua hitaammin. Oikeilla ajo-olosuhteilla kromatografian erottelukyky saadaan todella suureksi eri yhdisteiden kulkeutuessa eri nopeuksilla ja eluoitua eri aikaan. Nestekromatografiassa ajoliuokseen liuotettu näyte pumpataan erottelevan kiinteän faasin läpi. Eri yhdisteiden kemiallisista eroista johtuen ne muodostavat voimakkuudeltaan erilaisia vuorovaikutuksia kiinteän faasin kanssa, jolloin ne pystytään uuttamaan faasista vuorovaikutuksen voimakkuuden mukaisessa järjestyksessä. Polaarisuusero näytteen ja kiinteän faasin välillä aiheuttaa näytteessä olevien erilaisten yhdisteiden liikkeen hidastumisen ajoliuoksessa. Muutamalla olosuhteella esim. ajoliuoksen koostumusta ja virtausnopeutta, voidaan näytteessä olevat yhdisteet uuttaa ulos kiinteästä faasista hyvin tarkasti eroteltuina. Tässä työssä käytettiin korkean erottelukyvyn nestekromatografiaa (HPLC, high performance liquid chromatography).

Massaspektrometria (MS, Mass Spectrometry) on analyysimenetelmä, jolla voidaan selvittää yhdisteiden ja niiden osien massa, ja massojen perusteella alkuainekoostumus (Jaarinen & Niiranen 2008). Massaspektrometrissä tutkittava yhdiste ionisoidaan, jolloin varautuneet ionit ja niiden erikokoiset fragmentit voidaan erotella massansa perusteella. Näiden fragmenttien massoista voidaan päätellä tutkittavan yhdisteen aminohappo- (peptidin kyseessä ollen) ja alkuainekoostumus vertaamalla fragmenttien massoja tunnettuihin vertailuaineisiin, ja kokoamalla fragmenteista kokonainen molekyyli.

Tyypillisesti massaspektrometri on liitetty kromatografiin, josta näyte syötetään massaspektrometriin valmiiksi eroteltuna. Tässä työssä käytettiin HPLC-laitetta käänteisfaasikolonilla näyteseoksen sisältämien yhdisteiden erottelumiseksi. Näytteen saapuessa massaspektrometriin se ionisoidaan ja tarvittaessa myöhemmässä vaiheessa hajotetaan pienemmiksi massafragmenteiksi. Ionisaattorista ionit lentävät tyhjiössä massaerottelulaitteen läpi detektoriin, jotka yhdessä ilmaisevat ionin massan ja lukumäärän. Tässä työssä käytettiin kahdenlaista massaspektrometriä. Molemmissa ionisointi perustuu elektronisuihuionisaatioon (Electrospray ionisation, ESI), massaerottelu perustuu toisessa ioniloukkutekniikkaan (Ion trap Mass Spectrometry; ITMS) ja toisessa lentoaika-analyysiin (Time Of Flight, TOF).

ESI-tekniikassa nestemäinen näyte syötetään emitterin läpi, jossa suurella jännitteellä sumutetaan neste aerosoliksi (Bruins 1998, Ho ym. 2003). Näytteeneste syötetään kapillaariputken läpi, ja putken päässä voimakas sähkökenttä saa aikaan elektrostaattisen repulsion, joka vetää positiivisesti varautuneen pisaran nesteen pinnasta vastaelektrodia kohti. Sähkökentän kääntäminen saa aikaan negatiivisesti varautuneita pisaroita. Elektrostaattisen repulsion kasvaminen voimakkaammaksi kuin nesteen pintajännitys sai aikaan pisaran irtoamisen, ja pisaran irrottua ajoliuos haihtuu ja pisara pienenee. Pysyvät lentävät kaa-sun, tyypillisesti typen (N), läpi ja niihin vaikuttaa myös liikkeestä aiheutuva leikkausvoima. Lopulta voimat johtavat pisaran hajoamiseen mikropisaroiksi. Lopulta yksittäiset ionit siirtyvät kohti vastaelektrodia.

ITMS-tekniikassa ionit vangitaan ioniloukkuun kolmen elektrodin väliin (Höym. 2003, Jaarinen & Niiranen 2008). Ionisuihkusta tulevat ionit ohjataan ioniloukkuun sisääntuloelektrodin kautta. Sisääntuloelektrodin jälkeen ionit jäävät loukkuun rengaselektrodin muodostamaan tilaan. Radiotaajuisen sähköisen jännitteen avulla ionit saadaan stabiloitua loukkuun elektrodien välille. Muuttamalla jännitteen taajuutta voidaan ioneja ohjata ulos loukusta niiden massa-varaus-suhteen mukaan. Näin kaikki loukussa olleet erikokoiset ionit voidaan ohjata detektorille yksi ryhmä kerrallaan.

Q ja TOF-tekniikassa ioneja erotellaan kahdella tekniikalla, kvadrupolilla ja lentoaikamassa-analyysillä. Kvadrupoli koostuu neljästä yhdensuuntaisesta elektrodisauvasta, joiden välistä ionit lentävät. Sauvoissa olevaa sähkövirtaa ohjaamalla vaikutetaan niiden välissä olevaan värähtelevään sähkökenttään, joka valikoi kerrallaan tietyn massa-varaussuhteen omaavat ionit pääsemään läpi kvadrupolista detektorille. Erikokoiset ionit voidaan valita yksi kokoryhmä kerrallaan lentämään detektoriin. Lentoaikamassa-analyysi perustuu eri massaisten ionien nopeuseroihin (Wiley & McLaren 1955). Ioneja kiihdytetään sähköisellä jännitteellä, jolloin kevyemmät ionit liikkuvat kohti detektoria nopeammin kuin raskaammat. Kevyen ja raskaan ionin lähtiessä liikkeelle samaan aikaan on kevyempi ensin detektorilla. Hyvin kalibroitu laite antaa lentoon kuluneen ajan perusteella ionin massan.

1.5.2. Stereokemiallinen analyysi

Aminohapoista haluttiin selvittää myös niiden stereokemia, L- ja D-muotojen molempien ollessa mahdollisia. Marfeyn reagenssi eli FDAA on aminohaptoanalyysissä käytettävä kemikaali (Marfey 1984, Fujii ym. 1997B, Fujii ym. 1997C). Se reagoi aminohappojen kanssa muodostaen kovalenttisen sidoksen. Marfeyn reagenssin liittyminen aminohappoon vaikuttaa sen hydrofobisuuteen ja retentioaikaan HPLC:ssä. Reagenssi sitoutuu samalla tavalla aminohappojen D- ja L- muotoihin, mutta kuitenkin aiheuttaen näiden eluoitumisen HPLC:ssä eri aikaan. Kun samalla laitteella ajetaan vertailtavaksi Marfeyn reagenssin

kanssa reagoineet tunnetut L- ja D- muodot, voidaan näitä verrata tutkittuun yhdisteeseen ja päätellä retentioajan perusteella kumpi stereomeeri on näytteessä.

1.5.3. AntiSMASH ja bioinformatiikka

NRPS ja PKS –geenirykelmien tunnistamiseksi DNA-sekvessistä käytetään AntiSMASH-ohjelmaa (Medema ym. 2011, Blin ym. 2013, Weber ym. 2015). Ohjelma vertaa syötettyä DNA-sekvenssiä tietokantaan, joka sisältää tunnettujen NRPS- ja PKS –geenien sekvenssejä. Ohjelma tietää tunnettujen sekvenssien eri osat ja tunnistaa eri domeenit ja ennustaa adenylaatiodomeenin sitovan substraatin. NRPS ja PKS –sekvenssien lisäksi AntiSMASH tunnistaa myös muita bioaktiivisia yhdisteitä syntetisoivia geenejä.

AntiSMASH (Antibiotic and secondary metabolic analysis shell) on internet-selaimella käytettävä palvelu, joka etsii syötetystä DNA-sekvenssistä mahdollisia sekundaarimetaboliitteja. Sekundaarimetaboliitit ovat organismin tuottamia yhdisteitä, jotka eivät ole eloonjäämisen ja lisääntymisen kannalta välttämättömiä, esimerkiksi antibiootit ja pigmentit, jotka suojaavat organismeja pedoilta, auttavat kilpailussa muita lajeja vastaan ja suojaavat ympäristön fysikaalisilta ja kemiallisilta uhilta, kuten UV-säteily. Lajien väliseen kilpailuun tarvittavat yhdisteet ovat usein bioaktiivisuudeltaan kiinnostavia esimerkiksi antimikrobisilta ominaisuuksiltaan. Näiden aineiden joukkoon kuuluvat myös syanobakteerien NRPS- ja PKS-reittejä käyttäen tuotetut yhdisteet.

AntiSMASH on työkalu, joka yhdistää useita eri algoritmeja, ohjelmia ja tietokantoja yhdeksi kattavaksi kokonaisuudeksi sekundaarimetaboliittien biosynteesigeenien löytämiseksi. Se käyttää muun muassa NRPS-predictor ohjelmaa NRPS-geenien ja moduulien tunnistamiseen ja adenylaatiodomeenien substraatin tunnistamiseen. Käytännössä ohjelma vertaa syötettyä sekvenssiä tietokannoissa oleviin jo tunnettuihin biosynteesigeeneihin. Löytäessään sekvenssien välillä riittävän vastaavuuden, se esittää todennäköisen geenin löytyneen.

2. Tutkimuksen tavoitteet

Brasilian Pantanal-kosteikon *Nostoc* sp. CENA543–kannasta oli alustavasti löydetty nodulariinia ja spumigiinin kaltaista yhdistettä nestekromatografisin ja massaspektrometrisin työkaluin. Tämän työn tavoitteena oli viedä tutkimusta eteenpäin seuraavilla tavoitteilla:

- Seuloa Brasiliasta saatuja CENA-kantoja bioaktiivisten yhdisteiden varalta
- Tutkia *Nostoc* sp. CENA543-kannan kasvua erilaisissa kasvatusolosuhteissa
- Selvittää pseudospumigiinin kemiallinen rakenne käyttäen LC-MS- ja NMR-tekniikoita ja tehdä aminohappoanalyysi Marfeyn menetelmällä
- Selvittää *Nostoc* sp. CENA543 -kannan tuottamien pseudospumigiinin ja nodulariinin määrä
- Eristää ja sekvensoida *Nostoc* sp. CENA543-kannan genomi, löytää sen NRPS– ja PKS –geenirykelmät ja selvittää pseudospumigiinin biosynteesigeenit
- Tutkia pseudospumigiinin entsyymi-inhibitio aktiivisuutta
- Tuottaa tarvittava tulosaineisto tieteellistä julkaisua varten.

3. Aineisto ja menetelmät

3.1. Työssä käytetyt bakteerikannat ja kasvatusolosuhteet

3.1.1. Työssä käytetyt bakteerikannat

Työssä käytettiin näytteinä Pantanal-kosteikolta eristettyjä bakteerikantoja ja *Nodularia spumigena* AV1 -bakteerikantaa. Pantanal-kosteikon näytteidenotto- ja kasvatusmenetelmät on kuvattu aiemmassa tutkimuksessa (Andreote ym. 2014). Kannat ovat lueteltuina taulukossa 1.

Taulukko 1. Työssä käytetyt syanobakteerikannat.

Kanta	Eristyspaikka	Kasvatusalusta
<i>Nostoc</i> sp. CENA511	Salina Verde	Z8
<i>Nostoc</i> sp. CENA 513	Salina Verde	Z8x
<i>Nostoc</i> sp. CENA 514	Salina Verde	Z8x
<i>Pantanalinema rosaneae</i> CENA 516	Salina Verde	Z8
<i>Pantanalinema rosaneae</i> CENA 517	Salina Verde	Z8
<i>Nostoc</i> sp. CENA 524	Salina Verde	Z8x
<i>Geminocystis</i> sp. CENA526	Salina Centenario	Z8
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528	Salina Preta/Centenario	Z8
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA531	Salina Preta/Centenario	Z8
<i>Nostoc</i> sp. CENA 535	Salina Verde/Vermelha	Z8x
<i>Pantanalinema rosaneae</i> CENA537	Salina Grande/Vermelha	Z8
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA540	Salina Verde/Vermelha	Z8
<i>Microchaetaceae</i> / <i>Tolypothrichaceae</i> CENA541	Salina Verde/Vermelha	Z8x
<i>Nostoc</i> sp. CENA 543	Salina 67 Mil	Z8x
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA546	Salina 67 Mil	Z8
<i>Nostoc</i> sp. CENA 548	Salina Verde/Vermelha	Z8x

3.1.2. Kasvatusolosuhteet

Työssä käytettiin syanobakteerien kasvattamiseen kehitettyjä Z8-alustoja. Re-septit ovat liitteessä 2. Typeä sitomaan kykenevät kannat kasvatettiin typettömällä Z8X-alustalla. *Nostoc* sp. CENA543 kannan kasvatuksessa käytettiin myös Z8-maljoja puhdasviljelmän eristämiseksi. Bakteereja kasvatettiin 40 ml, 250 ml tai 2,7 l nestetilavuuksissa. 40 ml kasvatuksia käytettiin massaspektrometrijoihin, 250 ml kasvatuksia DNA:n eristykseen ja 2,7 l kasvatuksia pseudopumigiinin eristämiseen rakenne (NMR)- ja aminohappoanalyysia ja bioaktiivisuustestejä varten. Bakteereja kasvatettiin jatkuvassa 3-8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ valaistuksessa, huoneenlämmössä (17–24 °C). 2,7 litran massakasvatuksiin johdettiin jatkuvasti steriilisuodatettua ilmaa kaasujen vaihtamiseksi nesteessä.

Työssä käytettiin myös R2A –maljoja *Nostoc* sp. CENA543 -kannan akseenisuuden varmistamiseksi, kasvattamalla soluja R2A-agarilla ja mikroskopimalla soluja.

3.1.3. Kasvatus eri suolapitoisuuksissa

Nostoc sp. CENA543 -kannan sopeutumista 67 mil -lammen korkeaan suolapitoisuuteen testattiin kasvattamalla sitä eri suolapitoisuuksia sisältävillä kasvatusalustoilla. Andreoten ja muiden tutkimuksessa (2014) mainitaan lammen suolapitoisuuden ollessa korkeimmillaan kuivan kauden aikaan veden sähkönjohtavuudeksi 67 mS/cm, joka vastaa noin 5 % NaCl-suolaliuosta (Weast 1989).

Kokeessa käytettäväksi suolapitoisuuksiksi valittiin 0, 1, 2, 3, 4, 5 ja 6 %. Kasvatusalustat tehtiin käyttäen Z8xsalt -reseptiä, lisäten suolaliuoksen osuutta reseptissä halutun suolapitoisuuden saavuttamiseksi. Valmistettiin kasvatusalustat reseptien (Liite 1) mukaan (Taulukko 2) ja tarkistettiin niiden suolakonsentraatioiden vastaavuus sähkönjohtavuuteen sähkönjohtavuusmittarilla (Radiometer Meterlab CDM210 conductivity meter).

Taulukko 2. kasvatusalustojen suolapitoisuus ja sähkönjohtavuus.

Suolaa [%]	Z8S kantaliuos [ml]	H ₂ O	Z8IIX [ml]	Z8I [ml]	Z8III [ml]	Hivenaineliuos[ml]	Yht.	[mS/cm]
0	0	969	10	10	10	1	1000	0,8
1	100	869	10	10	10	1	1000	16,7
2	200	769	10	10	10	1	1000	31,7
3	300	669	10	10	10	1	1000	45
4	400	569	10	10	10	1	1000	58,4
5	500	469	10	10	10	1	1000	70,2
6	600	369	10	10	10	1	1000	81,7

Soluviljelmissä käytettyihin 250 ml kasvatuspulloihin (Sarstedt) lisättiin laminaarikaapissa 50 ml autoklavoitua kasvatusalustaa. Siirroksena käytettiin 28 päivää 2,7 litran tilavuudessa Z8x- alustalla kasvatettua viljelmää. Liuosta kaadettiin dekantterilasiin, jossa se homogenisoitiin pipetoimalla. Pulloissa olevaan kasvatusalustaan lisättiin pipetoimalla 1ml solususpensiota. Pullot asetettiin vaakatasoon valaistuun ravistelijaan, jonka lämpötila oli säädetty +18 °C lämpötilaan. Ravistelija asetettiin toimimaan 80 rpm nopeudella. Kasvatuspullojen korkeissa oli kalvo, jonka kautta kaasut pääsivät vaihtumaan pullon sisällä. Soluja inkuboitiin ravistelijassa 34 päivää.

Pullot otettiin ravistelijasta ja viljelmä suodatettiin suodatinkalvoille (Poretics, polycarbonate, 10.0 micron, Osmonics inc) pumpulla imien. Kalvot punnittiin ennen suodatusta. Kalvot huuhdeltiin 4 ml:lla Z8x alustaa, jotta kalvoon jäävä alustan suola ei vaikuttaisi punnitustulokseen. kalvot taiteltiin mikrosentrifugiputkiin tai asetettiin petrimaljalle kylmäkuivausta varten. Kalvot pakastettiin -80 °C lämpötilassa. Kalvot kylmäkuivattiin ja punnittiin. Kalvojen painojen erotuksesta ennen ja jälkeen suodatuksen saatiin näytteen biomassa.

3.2. Työssä käytetyt kemialliset menetelmät

3.2.1. Bioaktiivisten peptidien uuttaminen bakteereista

Peptidien uuttaminen aloitettiin pienillä määrillä bioaktiivisuustestejä varten ja peptidien tunnistamiseen massaspektrometrillä. Tämä uutto tehtiin mikrosentrifugiskaalalla metanoliuutona. Käytettyjä soluja kasvatettiin 40 ml kasvatusalustalla, viljelmä dekanttoitiin 50 ml sentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin 5 minuutin ajan 5000 g nopeudella. Supernatantti dekanttoitiin tai pipetoitiin pois. Jäljelle jäänyt solupelletti pakastettiin -20 °C lämpötilassa ja kylmäkuivattiin. Kylmäkuivatut solut siirrettiin mikrosentrifugiputkiin ja punnittiin. Putkiin lisättiin lasihelmiä ja 1 ml metanolia. Solut rikottiin Fastprep -laitteella 15 sekunnin ajan 6,5 m/s nopeudella. Solut ja lasihelmet sentrifugoitiin pelletiksi 5 minuutin ajan 20 000 g voimalla. Solujen rikkouduttua halutut bioaktiiviset aineet liukenivat su-

pernatanttiin, joka pipetoitiin uusiin mikrosentrifugiputkiin. Uuttotoimenpide solupelletilla toistettiin lisäämällä pellettien päälle 1 ml metanolia ja toistamalla Fastprep-käsittely ja sentrifugointi, jonka jälkeen saman näytteen supernatantit yhdistettiin. Supernatantit kuivattiin kylmäkuivaajalla (Christ Beta 2-8 LSC plus). Tämä uuttotoimenpide suoritettiin käyttäen kaikkia työssä mukana olleita CENA-kantoja.

Yhdisteiden rakenneanalyysiin tarvittiin huomattavasti suurempi ainemäärä tutkittavia yhdisteitä, joten siirryttiin käyttämään menetelmää, jolla saatiin suurempi määrä soluja uutettua kerralla. Mikrosentrifugiputkista siirryttiin 50 ml sentrifugiputkien käyttöön ja lasihelmien sijaan solut rikottiin Heidolph Silentcrusher M -homogenisaattorilla. Kylmäkuivattuja soluja punnittiin sentrifugiputkeen 1 g ja putkeen lisättiin 25 ml metanolia. Solut rikottiin Heidolph Silentcrusher M -homogenisaattorilla, jota käytettiin rikkomiseen 20 000 rpm kierrosnopeudella n. 30 s ajan, jolloin tutkittavat aineet liukenivat rikkoutuneista soluista metanoliin. Liuosta sentrifugoitiin 5 min 10 000 g nopeudella Eppendorf Centrifuge 5804 R -sentrifugilla. Supernatantti kerättiin ja uutto toistettiin solupelletillä ja 20 ml:lla metanolia. Metanoliuutteet yhdistettiin ja laimennettiin vedellä 80 % metanoliksi. Tämän jälkeen metanoliuute puhdistettiin hydrofobisista solukomponenteista kiinteäfaasiuutolla (solid phase extraction, SPE). Uutto suoritettiin Phenomenex C18-E 5g/20ml -kiinteäfaasiuuttopylväällä. Näyte puhallettiin pylvään läpi paineilmalla, kun pylväs oli ensin aktivoitu 20 ml 100 % metanolilla ja 20 ml 80 % metanolilla. SPE-pylvään läpi ajetusta liuoksesta haihdutettiin metanoli Büchi Rotavapor R-200 -pyöröhaihduttimella. Jäljelle jäänyt vesi kuivattiin Christ Beta 2-8 LSC plus -kylmäkuivaajalla. Näin saatiin kuiva jauhemainen seos solujen tuottamista aineista, jota jatkopuhdistettiin LC menetelmällä.

3.2.2. Peptidien tunnistus LC-MS-menetelmällä

Bioaktiivisten aineiden puhdistamiseksi ne tuli ensin tunnistaa ja saada eroteltua toisistaan. Tunnistukseen käytettiin lasihelmitekniikalla valmisteltuja uutteita bioaktiivisiksi todetuista näytteistä. Kylmäkuivatut näytteet liuotettiin metanoliin

ja ajettiin LC-MS:llä (Agilent 1100 series LC/MSD Ion Trap XCT Plus, Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). 10 µl näyte syötettiin Luna C18 kolonniin (2,1 x 100 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, Ca, USA). Ajo tehtiin isokraattisena käyttäen ajoliuoksina A: veteen liuotettu 0,1 % HCOOH B: asetonitrili, liuosten suhteen ollessa A: 70 % ja B: 30 %. Ajon kesto oli 49 minuuttia ja virtausnopeus 0,15 ml min⁻¹. Massaspektri kerättiin 26 000 m/z s⁻¹ (ultrascan positive electrospray mode) massa-varaussuhteen välillä m/z 300–2200.

Nostoc sp. CENA543:n tuottamien bioaktiivisten aineiden m/z arvot tunnettiin: nodulariinin (m/z 825) (Sivonen ym. 1989) desmetyylinodulaarin (m/z 811) (Karlsson ym. 2003), pseudospumigiinin variantit (m/z 595/591/579) (Jouni Jokela & Matti Wahlsten, Helsingin Yliopisto, suullinen tiedonanto 1.10.2015) ja anabaenopeptiinien variantit (m/z 792/806/808) (Reshef & Carmeli 2002).

3.2.3. Peptidien fraktiointi HPLC:llä

Peptidien tunnistamisen jälkeen voitiin aloittaa niiden puhdistaminen. Tätä varten ne tuli ajaa HPLC-tekniikalla eri yhdisteiden keräämiseksi niiden eluoiuessa kolonnista eli fraktioimalla.

Raakauutteesta havaitut peptidit eristettiin fraktioimalla uute Agilent 1100 -sarjan HPLC-laitteistolla. SPE-kolonnilla puhdistettu kylmäkuivattu näyte liuotettiin 2 ml:aan HPLC:ssä käytettyä ajoliuosta, A: 1 % ammoniumasetaatti veteen liuotettuna B: asetonitrili. Liuosten suhde ajoliuoksessa oli A: 78 % B: 22 %. HPLC ajossa käytettiin Phenomenex Luna 5u C8(2) 150x10 mm, 5 µm -HPLC-kolonnia ja ajo suoritettiin 5 ml/min virtausnopeudella. Massaspektrometrillä tunnistetut piikit kerättiin ajon yhteydessä lasiputkiin. Koko näyte injektoidiin 100 µl - 500 µl erissä laitteistoon. Samaa yhdistettä vastaavat fraktiot yhdistettiin ja laimennettiin 1:2 vedellä. Yhdistetyt fraktiot konsentroitiin kiinteäfaasiuutolla, Phenomenex Strata-X 1g/6ml -pylväillä. Pylväs valmisteltiin ajamalla sen läpi 6 ml metanolia ja 6 ml vettä. Tämän jälkeen fraktiot ajettiin pylvään läpi, jolloin eristettävät yhdisteet jäivät pylvääseen. Lopuksi pylväs pestiin 6 ml:lla vettä ja kuivattiin paineilmalla. Pylvääseen kiinnittynyt näyte irrotettiin eluoimalla pylväs 3 ml:lla metanolia.

Pseudospumigiinin argininaalin aldehydiryhmä aiheuttaa nestekromatografiassa yhdisteen eluoitumisen pitkällä aikavälillä leveinä piikkeinä, jolloin eri variantit eluoituvat päällekkäin eikä niitä saa eristettyä erikseen. Tätä varten fraktiointimenetelmään lisättiin vaihe, jossa aldehydi pelkistettiin alkoholiksi, jolloin se eluoituu kompaktimmin ja eri variantit saadaan kerättyä omina piikkeinään. Pelkistämiseen käytettiin natriumborohydridiä (NaBH_4). Näyte liuotettiin 15 ml:aan 100 % metanolia ja NaBH_4 :ää lisättiin näytteeseen 450 mg eli noin 30mg/ml. NaBH_4 pelkisti aldehydin alkoholiksi ja vetyä vapautui kaasuna näytteestä. Metanoli kuivattiin pyöröhaihduttimella ja näyte ajettiin nestekromatografisesti kuten edellä.

3.2.4. Aminohappoanalyysi

Aminohappoanalyysi tehtiin pseudospumigiinin aminohappojen stereokemian selvittämiseksi. Analyysi tehtiin hydrolysoimalla puhdistettu pseudospumigiini eri aminohappojen erottamiseksi toisistaan ja käsittelemällä aminohapposeos Marfeyn reagenssilla ja analysoimalla aminohapot LC-massaspektrometrillä.

Pseudospumigiini hydrolysoitiin suolahapolla, jotta yksittäisiä aminohappoja kyettäisiin tarkastelemaan erikseen. Tämä tehtiin liuottamalla *Nostoc* sp. CENA543 -soluista eristetty kuiva pseudospumigiini metanoliin, jota siirrettiin 50 µg:a pseudospumigiinia vastaava määrä liuosta lasiampulliin, jossa metanoli kuivattiin pois typpipuhalluksella. Neljän ml:n HPLC-putkeen lisättiin 500 µl 6 M HCl- liuosta, ja näyteampulli asetettiin aukinaisena suolahappoa sisältävään putkeen, joka suljettiin korkilla. Putki asetettiin uuniin 110 °C lämpötilaan. Tässä lämpötilassa suolahappo höyrystyy putkessa, ja pääsee hydrolysoimaan ampullissa olevan näytteen. Näytteen annettiin inkuboitua 12 h.

Näytteet otettiin uunista ja näyteampullissa olleet nestejäämät kuivattiin RVC 2-18 CD plus (Christ) -tyhjiökuivaajalla. Suolahapon hydrolyysin irrottamat pseudospumigiinin aminohapot derivoitiin massaspektrometristä analyysiä varten Marfeyn reagenssilla, lisäämällä ampulliin:

50 µl	H ₂ O
20 µl	NaHCO ₃
100µl	Marfeyn reagenssi (FDAA tai FDLA)

Näytteitä inkuboitiin 1 h ajan 37 °C lämpötilassa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 20 µl 1 M HCl liuosta. Referenssiaminohappojen käsittely Marfeyn reagenssilla tehtiin samalla menetelmällä. Hydrolysoitu ja Marfeyn reagenssilla derivoitu näyte, sekä Marfeyn reagenssilla käsitelty referenssiaminohapot ajettiin massa-spektrometrillä (Acquity I-class UPLC – Synapt G2-Si HDMS, Waters corp., Milford, MA, USA). Ajoliuoksina käytettiin A: 0,1 % HCOOH vesiliuosta ja 0,1 % B: asetonitrililiuosta gradientilla B 5 % -95 % viiden minuutin aikana. QTOF kalibroitiin *m/z* alueelle 91,036–472,726 tai 1178,651–2121,195 ajosta riippuen ja spektri kerättiin massa-varaussuhde välillä *m/z* 50–200 tai 1500–2200 ajosta riippuen (positive ionization resolution mode).

Aminohappoanalyysi tehtiin käyttäen referenssiaminohappoja:

L-Valiini (L-Valine, Sigma)

D-Valiini (D-Valine, Sigma)

L-Leusiini (L-Leucine, Sigma)

D-Leusiini (D-Leucine, Sigma)

L-Isoleusiini (L-Isoleucine, Sigma)

L-*allo*-isoleusiini (L-*allo*-Isoleucine, Sigma)

D-Isoleusiini (D-Isoleucine, Sigma)

N-metyyli-L-tyrosiini (N-methyl-L-tyrosine hydrobromide, ABCR)

L-Homotyrosiinia (L-homotyrosine hydrobromide, ABCR)

D-Homotyrosiinia (D-homotyrosine hydrobromide, ABCR)

(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-hydroxypropionic acid (ABCR)

DL-p-hydroxyphenyllactic acid (Sigma-Aldrich)

DL-Homofenyylalaniini (DL-Homophenylalanine, Sigma-Aldrich)

3.2.5. Pseudospumigiinin kvantitointi

Pseudospumigiini kvantitoitiin keräämällä HPLC-fraktiot yhteen 4 ml koeputkeen ja punnitsemalla putken massan muutos fraktioiden kuivaamisen jälkeen. Pseudospumigiinin massa jaettiin näytteen valmistamiseen käytettyjen kylmäkuivatusten solujen massalla.

3.2.6. Nodulariinin kvantitointi

Nodulariini kvantitoitiin massaspektrometrillä menetelmällä. Nodulariini-R standardista tehtiin laimennossarja 100 % metanoliin (Taulukko 3).

Taulukko 3. Nodulariinista tehty laimennossarja standardisuoraa varten.

Laimennos	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsentraatio [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.0078125

Uutettiin *Nostoc* sp. CENA543 kantaa 10,14 mg ja *Nodularia spumigena* AV1 kantaa 12,45 mg punnitsemalla solut mikrosentrifugiputkiin, joihin lisätiin 1 ml metanolia ja lasihelmiä. Solut rikottiin Fastprep-24 -laitteella nopeudella 6,5 m/s 15 s ajan. Näyte sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 5 min ja kerättiin supernatantti. Supernatantti laimennettiin metanolilla 1:10 ja 1:50. Nodulariinistandardisuora ja uutetut näytteet ajettiin Q-TOF:lla, ja integroitiin ionikromatogrammin nodulariinipiikki. Piikkien pinta-aloja vertaamalla määritettiin nodulariinin määrä.

3.2.7. Spektrofotometrianalyysi

UV-spektrin mittaamista varten puhdistettu ja kuivattu pseudospumigiininäyte liuotettiin 100 % metanoliin pitoisuuteen 0,033 mg /ml ja mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV-1800) aallonpituuksilla 190 – 400 nm. Ekstinktiokertoimet laskettiin paikallisille absorbtiomaksimeille.

3.2.8. DNA:n eristys

Nostoc sp. CENA543 -kannan tuottamien yhdisteiden rakenteen lisäksi haluttiin selvittää myös niiden biosynteesi solussa. Tätä varten soluista tuli eristää DNA, jonka sisältämästä informaatiosta pystyttäisiin löytämään yhdisteiden biosynteesiin osallistuvat geenit ja selvittämään geenien toiminta solussa.

DNA:n eristäminen aloitettiin keräämällä 250 ml Z8X-alustalla kasvatettuja soluja. Soluja kerätessä niitä käsiteltiin hellävaroen, koska ne haluttiin säilyttää ehjinä, jotta DNA ei karkaisi solujen rikkoutuessa kasvatusliuokseen. Solut kerättiin sentrifugoimalla solullista kasvatusalustaa 5000 g nopeudella 5 min, jonka jälkeen supernatantti poistettiin. Tämän jälkeen solut pestiin liuottamalla solupelletti 20 ml:aan TE-puskuria [50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM EDTA, 100mM NaCl]. Solut sentrifugoitiin 5000 g nopeudella 5 min. Supernatantti poistettiin mahdollisimman tarkasti. Solupelletti suspendoitiin 5 ml:aan TE-puskuria, siirrettiin 10 ml sentrifugiputkiin ja pakastettiin -80 °C lämpötilassa. Pakastetut solut sulatettiin 20 °C vesihauteessa. Lisättiin lysotsyymiä (Lysozyme from chicken egg white, Sigma) pitoisuuteen 2 mg/ml eli 10 mg sekä RNAasia (Rnase A, 10 mg/ ml) Omega Bio-Tek) pitoisuuteen 20 µg/ml eli 10 µl. Lysotsyymi lisättiin hajottamaan soluseinä DNA:n vapautumiseksi ja RNAasi RNA:n pilkkomiseksi, jotta se ei myöhemmin kontaminoisi puhdistettua DNA:ta. Inkuboitiin 37 °C lämpötilassa 1,5 h. Lisättiin 10 % sarkosyyliä (N-lauroyl sarcosine sodium salt, Sigma) 1 % pitoisuuteen eli 500 µl sekä proteinaasi K:ta (Proteinase K, Macherey-Nagel) pitoisuuteen 200µg/ml eli 50 µl. Inkuboitiin 50 °C lämpötilassa 2 h. Sarkosyyli lisättiin DNA transkription estämiseksi ja proteinaasi K proteiininen pilkkomiseksi, jotta ne eivät tekisi muutoksia DNA:han.

Lisättiin 5 ml fenolia ja käännettiin putkia. Sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 7 min. Siirrettiin DNA:n sisältämä vesifaasi uusiin putkiin. Lisättiin 5 ml kloroformia, sekoitettiin kääntelemällä, sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 5 min. Siirrettiin vesifaasi uusiin putkiin. Lisättiin 5 ml isopropanolia DNA:n saostamiseksi. Sekoitettiin kääntelemällä, sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 15 min +4 °C lämpötilassa. Saostunut DNA muodosti pelletin putken pohjalle, poistettiin

neste putkesta varovaisesti rikkomatta pellettiä, lisättiin 1 ml 70 % etanolia DNA:n pesemiseksi. Sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 5 min. Poistettiin etanoli mahdollisimman tarkasti ja annettiin lopun nesteen kuivua pois 37 °C lämpöhauteessa. Suspendoitiin pelletti 0,1 ml:aan TE-puskuria ja siirrettiin mikrosentrifugiputkiin. DNA eristyksen onnistumisen tutkimiseksi DNA-liuos tarkistettiin Nanodrop1000 (Thermo Scientific) -spektrofotometrillä ja ajamalla agarosigeelielektroforeesi. 0,6 % agarosia sisältävällä geelillä ajettiin 45 min ajan 70 V jännitteellä. DNA osoittautui hyvin kontaminoituneeksi elektroforeesissa ja Nanodrop-testissä, joten päätettiin kokeilla toista menetelmää, jolla polysakkariidikontaminaatiosta päästäisiin eroon.

Kerättiin solut 250 ml nesteviljelmästä mikrosentrifugiputkeen. Putkeen lisättiin lasihelmiä. Pakastettiin -80 °C. Sulatettiin 50 °C vesihauteessa. Lisättiin 800 µl lyysauspuskuria (Liite 2). Rikottiin soluja Fastprep-laitteella 20 s ajan 5m/s teholla. Pidettiin putkia jäällä 5 min. Sentrifugoitiin 1 min ajan 15 000 g nopeudella. Siirrettiin DNA:n sisältävä supernatantti uusiin putkiin. Pelletin päälle lisättiin vielä 400µl:llä lyysauspuskuria ja toistettiin Fastprep-käsittely ja sentrifugointi, ja kerättiin supernatantti. Yhdistettiin supernatantit. Supernatanttiin lisättiin 675 µl 5 M NaCl:a, sekä 10 % CTAB 510 µl. Inkuboitiin 65 °C lämpötilassa 20 min. Lisättiin kloroformia 2385 µl. Sekoitettiin ja sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 7 min ajan. Siirrettiin vesifaasi uusiin putkiin. Lisättiin näihin putkiin 2385 µl fenoli-kloroformia, sekoitettiin, ja sentrifugoitiin 10 000 g nopeudella 7 min ajan. Vesifaasi siirrettiin uusiin putkiin. Näytteen sekaan lisättiin 2385 µl isopropanolia, sekoitettiin ja sentrifugoitiin 13 min 10 000 g 4 °C lämpötilassa. Neste poistettiin putkista, ja niihin lisättiin 500 µl 70 % etanolia, siirrettiin samalla näyte mikrosentrifugiputkiin. Sentrifugoitiin 5 min 10 000g. Pipetoitiin etanoli putkista ja haihdutettiin loput 37 °C lämpöhauteella.

Liuotettiin pelletti 800 µl:n TE-puskuria ja lisättiin RNAasia pitoisuuteen 20 µl/ml, eli 1,6 µl 10 mg/ml RNAasia, sekä NaCl pitoisuuteen 0,2 M, eli 5M NaCl:a 32 µl. Inkuboitiin 30 min 37 °C lämpötilassa. Lisättiin fenoli-kloroformia 833,6 µl, sentrifugoitiin 5 min 20 000. Siirrettiin vesifaasi uusiin putkiin, jotka uutettiin 833,6 µl, sentrifugoitiin 5 min 16 000g. Siirrettiin vesifaasi uusiin putkiin ja saostettiin DNA lisäämällä 833,6 µl isopropanolia, sekoitettiin ja sentrifugoitiin 14 000

g 10 min. Poistettiin neste, lisättiin 70 % etanolia 0,5 ml. Sentrifugoitiin 14 000 g nopeudella 5 min. Pipetoitiin etanoli pois ja kuivattiin näyte lämpöhauteessa. Liuotettiin kuivattu näyte 100 µl:aan TE-puskuria ja säilöttiin se jääkaappiin.

3.2.9. Sekvensointi ja sekvenssitiedon kooste (assembly)

Nostoc sp. CENA543 –kannan DNA:n sekvensoinnin suoritti Whole Genome Shotgun sequencing (WGS) menetelmällä Macrogen Next Generation Sequencing Division, Soul, Etelä-Korea. Macrogenilta saaduista sekvensseistä koottiin skaffoldit käyttäen Newbler 3.0 ja Spades 3.7.1 -ohjelmia.

3.2.10. NRPS- ja PKS-synteesigeenien etsiminen

AntiSMASH (antibiotic and secondary metabolite analysis shell) -ohjelmalla etsittiin genomista NRPS- ja PKS-synteesigenejä. AntiSMASH tunnistaa sekundaarimetaboliittien synteesigeenit vertaamalla sekvenssiä tunnettujen synteesigeenien sekvensseihin (Weber ym. 2015). Ohjelma tunnistaa monenlaisia genejä mukaan lukien NRPS- ja PKS genejä, joihin tässä työssä kiinnitettiin erityistä huomiota. NRPS- ja PKS-geenien tunnistamisen lisäksi ohjelma tunnistaa niiden sisältä erilliset proteiininen domeeneja koodaavat sekvenssit, kuten kondensaatio-, adenylaatio- ja tiolaatiodomeenien sekvenssit. Vertaamalla tunnettujen proteiinien geeneihin sen avulla voidaan selvittää myös adenylaatiodomeenien tunnistama substraatti. Kaikkia mahdollisia adenylaatiodomeeneja ei löydy tietokannasta, ja tunnistussekvensseissä on variaatioita tietyn substraatin tunnistamiseksi. Jos haettua sekvenssiä ei löydy sellaisenaan tietokannasta, ei substraattispesifisyyden tunnistus ole täysin varma, vaan perustuu sekvenssien samankaltaisuuteen. AntiSMASH:in tunnistamia genejä tarkasteltiin Artemis-ohjelmalla (Rutherford ym. 2000). Ohjelmaa käytettiin tunnistettujen geenien löytämiseksi sekvenssistä, jonka jälkeen kunkin geenin sekvenssi analysoitiin BLAST-ohjelmalla (Altschul ym. 1990). Myös tunnistettujen geenirykelmien sisällä ja ympärillä olevat sekvenssin avoimet lukukehykset tutkittiin geenirykelmän toimintaan liittyvien geenien varalta.

AntiSMASH-ohjelma tukena käytettiin NRPSpredictor2 (Röttig ym. 2011, Rausch ym. 2005) ja PKS/NRPS analysis -ohjelmia (Bachmann & Ravel 2009). NRPS/PKS -geenirykelmien lähelle sijoittuvia muita geenejä tutkittiin myös CD-search -työkalulla (Marchler-Bauer ym. 2015).

3.2.11. Fylogenia

Nostoc sp. CENA543 -kannan fylogeniaa tutkittiin tekemällä evoluutiopuu, johon sisällytettiin *Nostoc* -sukujen tyyppikantoja (Herdman ym. 2015) ja joitakin sekvensoituja CENA -kantoja, sekä ulkoryhmäksi *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Puu tehtiin phylogeny.fr-palvelussa (Dereeper ym. 2008, 2010).

3.3. Bioaktiivisuustestit

Työssä tutkittiin käytettyjen yhdisteiden bioaktiivisuutta kiekkodiffuusiotestillä ja trypsiini-inhibitiotestillä. Kiekkodiffuusiotestillä selvitetään, estääkö tutkittu aine valittujen organismien kasvua agarmaljalla ja trypsiini-inhibitiotestillä tutkitaan yhdisteen tehokkuutta trypsiinin inhiboimiseksi.

3.3.1. Kiekkodiffuusio maljoilla

Metanoliraakauutteiden bioaktiivisuutta testattiin maljoilla mikrobeja vastaan pahvikiekkotestillä. Bioaktiivisuutta testattiin kolmea eri mikrobia vastaan: *Candida albicans* HAMBI261, *Salmonella typhi* HAMBI1306 ja *Staphylococcus aureus* HAMBI166. *Candida* -hiivan kasvattamiseen käytettiin YM-agaria, *Staphylococcus* -kannan kasvattamiseen käytettiin BHI-agaria ja *Salmonella* -kannan kasvattamiseen käytettiin RV-agaria (kasvatusalustojen valmistusohjeet liitteessä 2).

Syanobakteerin metanoliuutetta pipetoitiin 350 µl pahvikiekolle (100 discs blank, Abtek biologicals). Negatiivisena kontrollina käytettiin pahvikiekkoa, jolle pipetoitiin 150 µl metanolia. Positiivisena kontrollina käytettiin bakteereille val-

miita kanamysiini-kiekkoja (100 sensitivity discs kanamycin 1000 µg, Abtek biologicals) ja *Candida* -hiivalle nystatiinikiekkoja. Nystatiiniliuos valmistettiin liuottamalla 5 mg nystatiinia (Nystatin mixture of A1,A2A3>70 % (vv), Sigma-Aldrich life sciences) yhteen millilitraan metanolia. Liuosta pipetoitiin pahvikiekoille 20 µl (100 µg) ja 40 µl (200 µg), eri pitoisuuksien testaamiseksi.

Maljoilla käytettävät näytekiekot valmistettiin käyttämällä metanolirakautetta näytekannoista. Kylmäkuivatuista soluista valmistettiin 1 ml metanolirakauute rikkomalla solut aiemmin luvussa 3.2.1 kuvatulla menetelmällä. Uutetta imeytettiin puhtaille kiekoille pipetoimalla sitä kiekon päälle 150 µl ja antamalla metanolin haihtua pois.

Kaikista käytetyistä mikrobeista siirrostettiin steriilisti laminaarikaapissa pumpulipuikolla pintahajotuksella uusille maljoille ja kasvatettiin maljoja yön yli +37 °C lämpötilassa, jotta käytettävissä olisi eksponentiaalisessa kasvun vaiheessa olevia soluja siirrettäväksi varsinaisille testimaljoille. Yön yli kasvatetuista viljelmistä otettiin pumpulipuikolla soluja 5 M NaCl liuokseen johon ne sekoitettiin niin, että liuoksen sameus vastasi Mcfarland-asteikon arvoa 0,5. Tätä liuosta levitettiin pumpulipuikolla tasaiseksi kerrokseksi uusille puhtaille maljoille. Heti levityksen jälkeen maljoille asetettiin näytekiekot sekä kontrollikiekot. Inkuboitiin maljoja 37 °C lämpötilassa 1 d, jonka jälkeen luettiin tulokset.

3.3.2. Trypsiini-inhibitio

Tässä kokeessa mitattiin pseudospumigiinin trypsiiniä inhiboivaa vaikutusta. Pseudospumigiinia kemiallisesti muistuttavat yhdisteet, kuten leupeptiini ja aeruginosiini ja spumigiinit, toimivat proteaasi-inhibiittoreina, ja päätimme kokeilla pseudospumigiinin toimintaa trypsiinin inhibiittorina. IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) on arvo, jota käytetään inhibiittorin tehon kuvaamiseen. Tässä kokeessa määritettiin pseudospumigiinin IC₅₀-arvo trypsiinin inhibitiassa. Koe tehtiin Kawabatan entsyymiaktiivisuusmetodilla (Kawabata ym. 1988), käyttäen substraattina Boc-Gln-Ala-Arg-MCA peptidiä ja entsyyminä trypsiiniä. MCA on fluoresoiva yhdiste, jonka trypsiini pilkkoo irti peptidistä. Trypsinin toimiessa reaktiossa MCA:ta vapautuu jatkuvasti enemmän, jolloin fluoresenssi kasvaa.

Fluoresenssia voidaan mitata spektrofotometrillä, ja sen määrästä voidaan suoraan lukea vapautuneen MCA:n määrä, josta voidaan päätellä trypsiinin pilkkomisreaktion nopeus. Pseudospumigiinin toimiessa trypsiinin inhibiittorina enemmän inhibiittoria sisältävissä näytteissä MCA:ta vapautuu vähemmän ja mittaamalla fluoresenssia voidaan laskea inhibiittorin vaikutus reaktiossa. Tässä työssä käytettiin Infinite M200, Tecan spektrofotometriä fluoresenssin mittaamisessa ja reaktiossa käytetyt liuokset tehtiin taulukon 4 mukaan.

Taulukko 4. Psp:n trypsiini-inhibitio reaktioon käytetyt liuokset.

Liuokset:	Määrä (µl):
Tris HCl pH 8.0	19,5
NaCl	19,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	19,5
BSA	19,5
Boc-Gln-Ala-Arg-7-amc	2
H ₂ O	115
Trypsiini	5
Yhteensä:	200

Ensimmäiseksi määriteltiin sopivat olosuhteet trypsiini ja MCA pitoisuuksille reaktiossa, jotta saataisiin mittalaitteen kalibraatioon sopiva fluoresenssireaktio, joka ei tapahdu liian nopeasti, niin että saadaan useampi mittauspiste. Tämä tehtiin jättämällä psp kokonaan pois reaktiosta. Oikeiden olosuhteiden ja konsentraatioiden haarukointi aloitettiin Liun (2014) tutkimuksen pohjalta. Leupeptiinistä ja pseudospumigiinista tehtiin laimennossarjat taulukon 5 mukaan.

Taulukko 5. Leupeptiinin ja pseudospumigiinin laimennossarjojen konsentraatiot IC₅₀ -testiä varten.

Laimennos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Leupeptiini											
[μM]	81,57	40,78	20,39	10,20	5,10	2,55	1,27	0,64	0,32	0,16	0,00
Pseudospumigiini											
[μM]	81,57	40,78	20,39	10,20	5,10	2,55	1,27	0,64	0,32	0,16	0,00

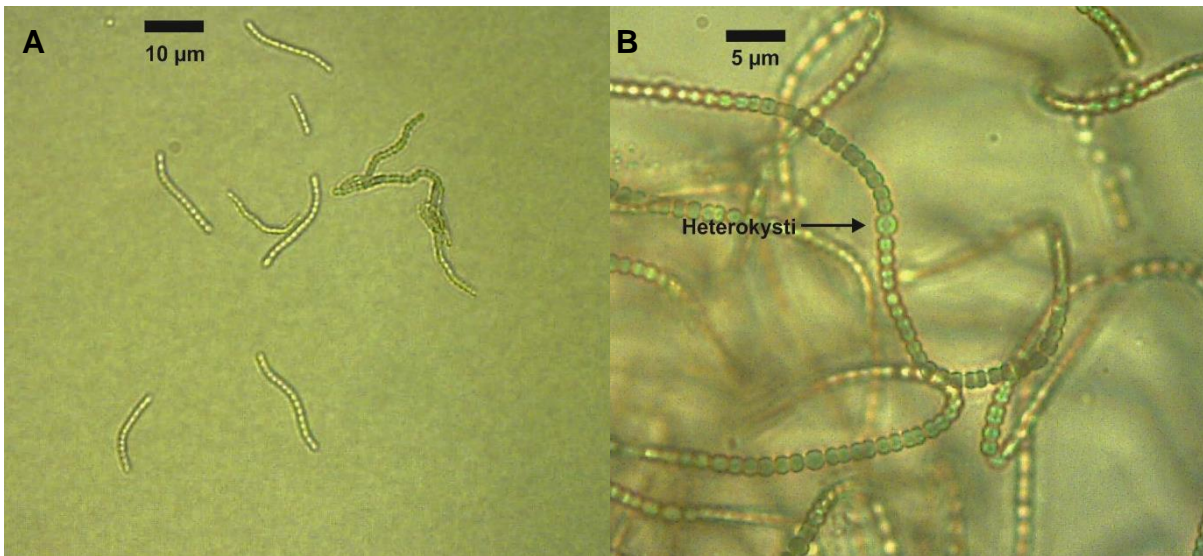
Kun sopivat olosuhteet oli löydetty, lisättiin pseudospumigiini reaktioon eri pitoisuuksina, ja ajettiin näytteet spektrofotometrillä. Laite keräsi datan fluoresenssin muutoksena ajan funktiona.

4. Tulokset

Työssä haluttiin selvittää *Nostoc* sp. CENA543-kannan tuottaman uuden tetrapeptidin rakenne, kvantitoida sen tuottama nodulariini ja sekvensoida sen koko genomi. Genomitiedon pohjalta tarkoituksena oli selvittää uuden tetrapeptidin biosynteesiin tarvittava geenirykelmä ja verrata nodulariinin ja anabaenopeptiinin geenirykelmiä tunnettuihin vastaaviin geeneihin.

4.1. Morfologia ja kasvu

Tarkasteltaessa syanobakteerikantaa mikroskoopilla huomattiin sen morfologian vastaavan *Nostoc* -suvun piirteitä (Kuva 7). Solujen halkaisija oli noin 2 μm.

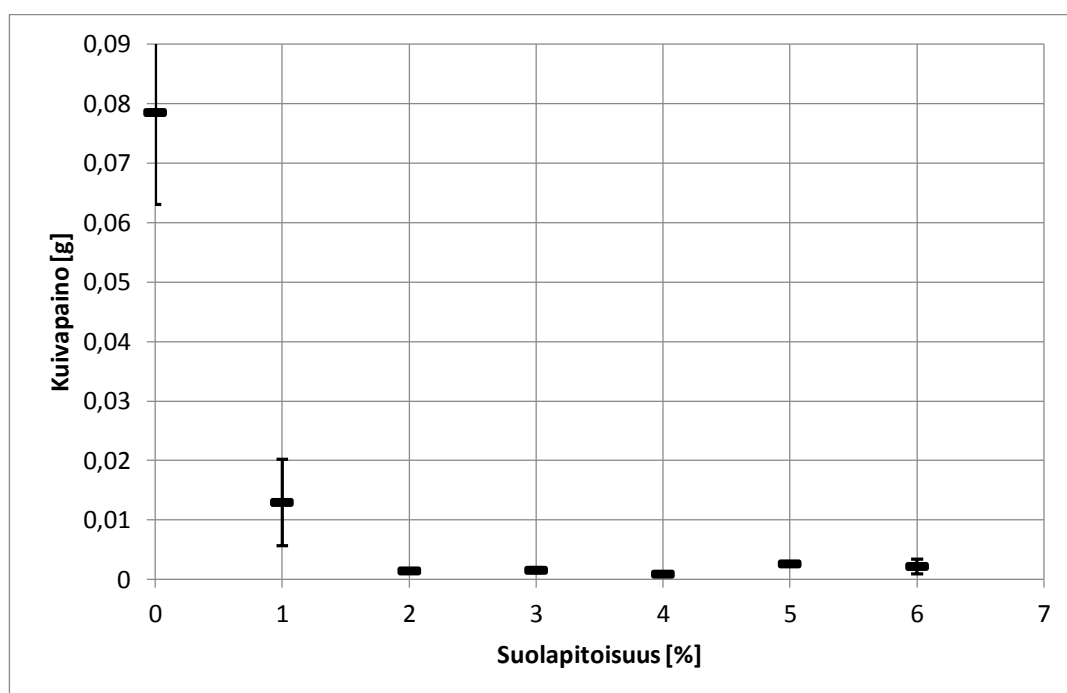


Kuva 7. *Nostoc* sp. CENA543 syanobakteereja mikroskooppikuivissa. A: Hormogonioita, jotka ovat liikkuneet pois alkuperäisestä siirrostuskohdasta, kuva agar-maljalta 200-kertainen suurennos B: Rihma, jossa typpeä sitova heterokysti, mikroskooppipreparaatti, 400-kertainen suurennos

Syanobakteerisoluja kasvatettiin syanobakteereille suunnitellulla Z8X- alustalla, johon ei ollut lisätty typen lähdettä. Solut kasvoivat hyvin alustalla. Kasvatusolosuhteiden vaikutusta kasvuun testattiin kasvattamalla kantaa Z8X-alustoilla, joihin oli lisätty eri määriä suolaa, koska kanta oli eristetty suolaisesta ympäristöstä (Kuva 8).

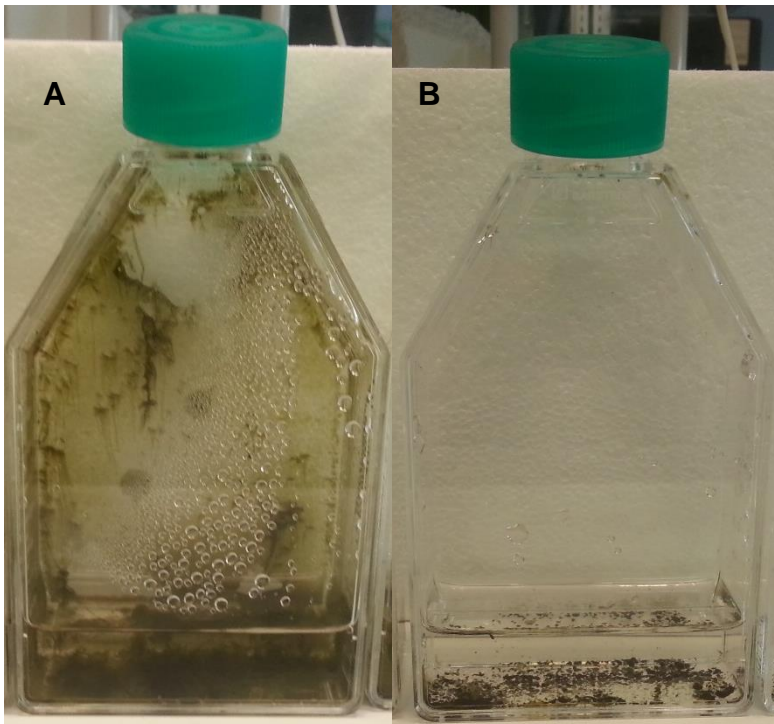


Kuva 8. *Nostoc* sp. CENA543 kasvatukset järjestettynä kohoavan suolapitoisuuden mukaan 34 päivän kasvatuksen jälkeen.



Kuva 9. *Nostoc* sp. CENA543 kasvatuksista kerätyn biomassan kuivapaino kasvatusalustan suolapitoisuuden mukaan.

Solujen viljely Z8X alustalla ilman lisättyä ylimääräistä suolaa tuotti kuivapainossa mitattuna selvästi eniten biomassaa. Biomassa oli myös tarttunut kasvatuspullon pintaan kiinni ja tuottanut paljon limaa. Solut ja lima olivat väriltään vaalean vihreitä. Yhden prosentin suola-alustalla kasvaneet solut olivat tuottaneet vähemmän biomassaa, eikä merkittävää määrää limaa esiintynyt. Solut olivat tumman vihreitä, jopa rusehtavia. Solut eivät olleet merkittävästi kiinnittyneet pintoihin. Suola-alustoilla 2 %, 3 %, ja 4 % kanta oli kasvanut hyvin heikosti. Neljän prosentin alustalla solut olivat vaalentuneet huomattavasti ja vihreää oli tuskin havaittavissa. Alustoilla 5 % ja 6 % ymppi oli vaalennut kokonaan ja kasvua ei ollut nähtävissä silmämääräisesti. Kuvissa 9 ja 10 nähdään selvästi, että heti siirryttäessä lisättyyn suolaan solujen kinnittyminen pintaan häviää liman tuotannon vähenemisen myötä ja solujen määrä vähenee.

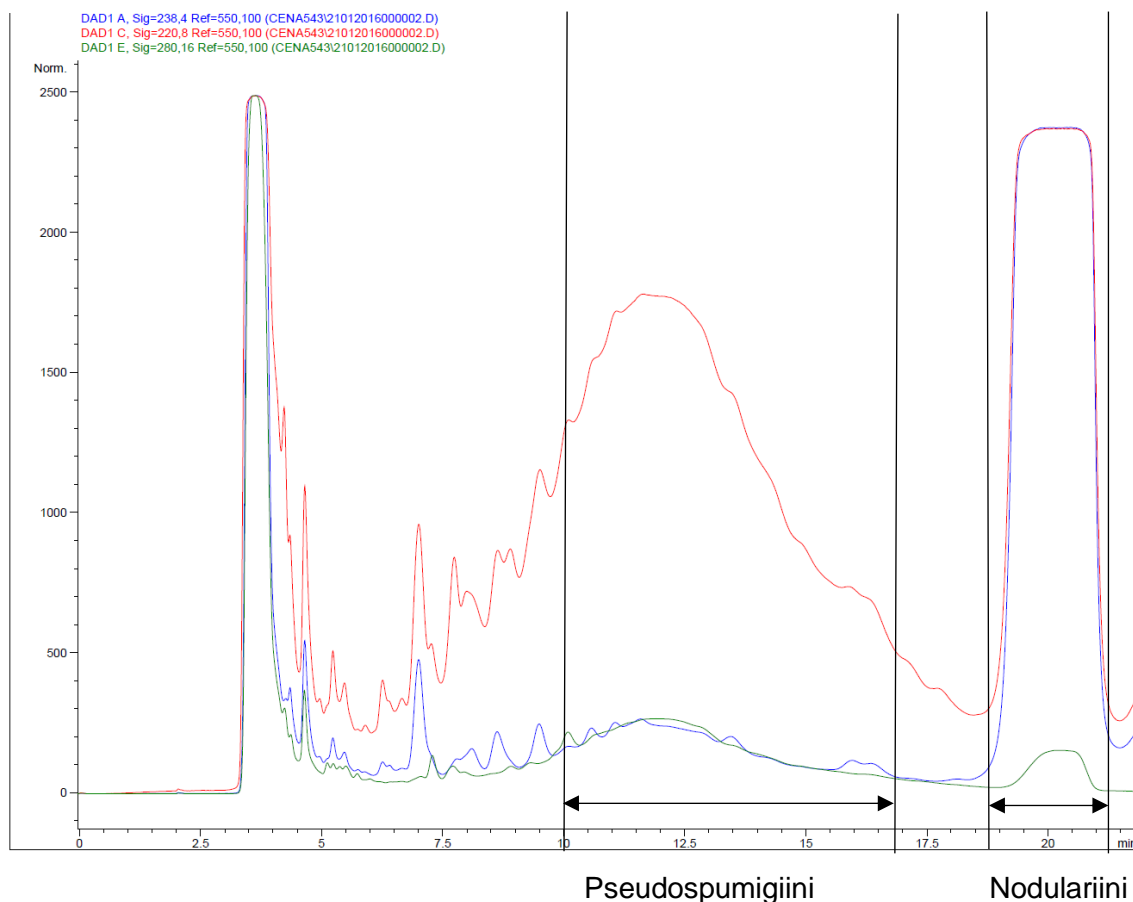


Kuva 10. *Nostoc* sp. CENA543 kasvatuspullot A: Z8X-alustalla (ei lisättyä suolaa) ja B: Z8XS-alustalla (1% suolapitoisuus) 34 päivän kasvatuksen jälkeen.

4.2. Pseudospumigiinin ja nodulariinin puhdistus HPLC:llä

Osana työtä oli tarkoitus selvittää pseudospumigiiniksi nimetyn uuden tetrapeptidin ja sen varianttien tarkka rakenne, sekä selvittää tuotetun nodulariinin määrä. Tätä varten yhdisteet piti ensin eristää ja puhdistaa *Nostoc* sp. CENA543-kannasta. Puhdistus tehtiin käyttäen HPLC-MS menetelmää, jossa metanoliin uutetun HPLC-kolonnein syötetyn näytteen sisältämät yhdisteet eluoi-
tuivat eri aikaan niiden poolisuuden mukaan. Kolonnista eluoituvan ajoliuoksen UV- ja massaspektrometrisiä signaaleja seuraamalla yhdisteet voidaan kerätä yksitellen. Protonoituneiden pseudospumigiinin ja nodulariinin massaspektrometrin havaitsemat m/z -arvot olivat jo tiedossa, pseudospumigiinin 613,4 (Jokela ym. 2017) ja Nodulariinin 825,6 (Karlsson ym. 2003). Pseudospumigiini- ja nodulariinifraktiot havaittiin eluentista UV:llä ja MS:llä, ja niiden kerääminen onnistui. Pseudospumigiinin eri variantit eluoiutuivat osaksi päällekkäin, kunnes

näyte pelkistettiin NaBH_4 :llä ennen HPLC-fraktiointia, jolloin eri variantit näkyivät selvästi omina piikkeinään UV-kromatogrammissa ja eluoituivat eri aikaan ja ne saatiin kerättyä omina näytteinään (Kuva 11).



Kuva 11. UV-kromatogrammit aallonpituuksilla 220 nm (punainen), 238 nm (sininen) ja 280 nm (vihreä) HPLC-ajosta pseudospumigiinin ja nodulariinin eristämiseksi.

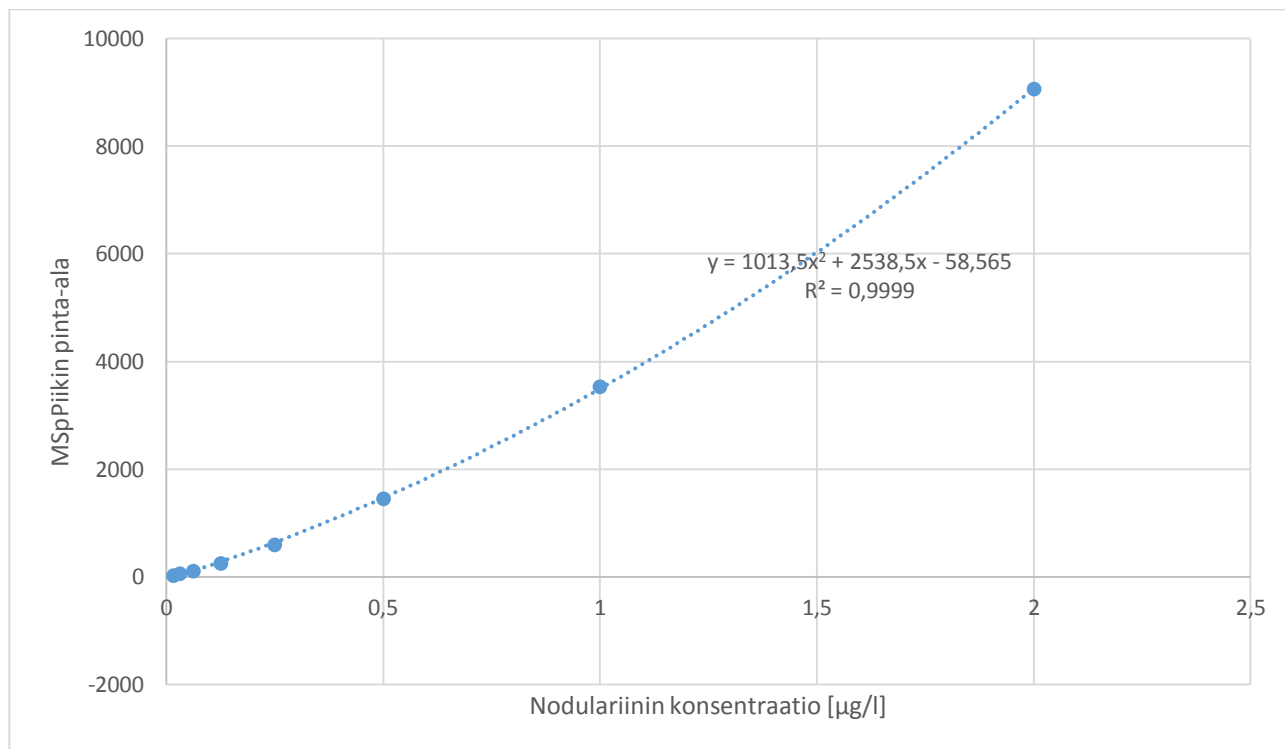
4.3. Pseudospumigiinin saanto

Kylmäkuivatuista soluista eristetyt pseudospumigiinit punnittiin. Ensimmäisestä erästä, johon oli käytetty 1,32 g kylmäkuivattuja soluja saatiin yhteensä 1,5 mg pseudospumigiinia ja toisesta erästä, johon käytettiin 2,38 g kylmäkuivattuja soluja saatiin 1,0 mg pseudospumigiinia.

4.4. Nodulariinisaanto

Solujen tuottaman nodulariinin määrä selvitettiin tekemällä LC-massaspektrometrillä standardisuora tunnetuilla nodulariinimäärillä, jonka jälkeen soluista eristetty nodulariini ajettiin LC-massaspektrometriin.

Nodulariinin standardiliuoksen laimennossarjasta tehdyn massaspektrometrin kvantitatiivisen analyysin tuloksista laskettiin kunkin liuoksen aikaansaaman nodulariini kromatogrammipiikin pinta-ala ja piirrettiin standardisuora (Kuva 12). Kuvasta nähdään, että vaste ei ollut lineaarinen vaan noudatti toisen asteen yhtälöä $y = 1013,5x^2 + 2538,5x - 58,565$.



Kuva 12. Nodulariinimäärän standardisuora, jolta luettiin näytteen nodulariinipitoisuus

Nostoc sp. CENA543-soluista tehdyn näytteen kvantitatiivisesta analyysistä massaspektrometrilla saatiin näytteen laimennoksille nodulariini kromatogrammiinkin pinta-alat: 1:50 laimennokselle 3081 ja 1:10 laimennokselle 25466. Laimennoksen 1:10 arvo ei osu standardisuoran alueelle, joten sitä ei voida pitää luotettavana. Ekstrapoloimalla sillekin voidaan kuitenkin määrittää arvo. Kun standardisuoran yhtälöön $y = 1013,5x^2 + 2538,5x - 58,565$ sijoitetaan *Nostoc* sp. CENA543-näytteestä tehdyn laimennoksen nodulariini kromatogrammiinkin pinta-ala ja tulos kerrotaan laimennuskertoimella ja jaetaan näytteen painolla 10,14 g saadaan nodulariinin massa verrattuna solujen massaan:

1:50 laimennos:

$$x = \frac{-2538,5 \pm \sqrt{2538,5^2 - 4 * 1013,5 * (-585,65 - 3081)}}{2 * 1013,5} \approx 0,91 \mu\text{g}$$

$$\frac{0,91 \mu\text{g} * 50}{10,14 \text{ g}} \approx 4,5 \mu\text{g/g}$$

1:10 laimennos:

$$x = \frac{-2538,5 \pm \sqrt{2538,5^2 - 4 * 1013,5 * (-585,65 - 25466)}}{2 * 1013,5} \approx 0,78 \mu\text{g}$$

$$\frac{0,78 \mu\text{g} * 50}{10,14 \text{ g}} \approx 3,8 \mu\text{g/g}$$

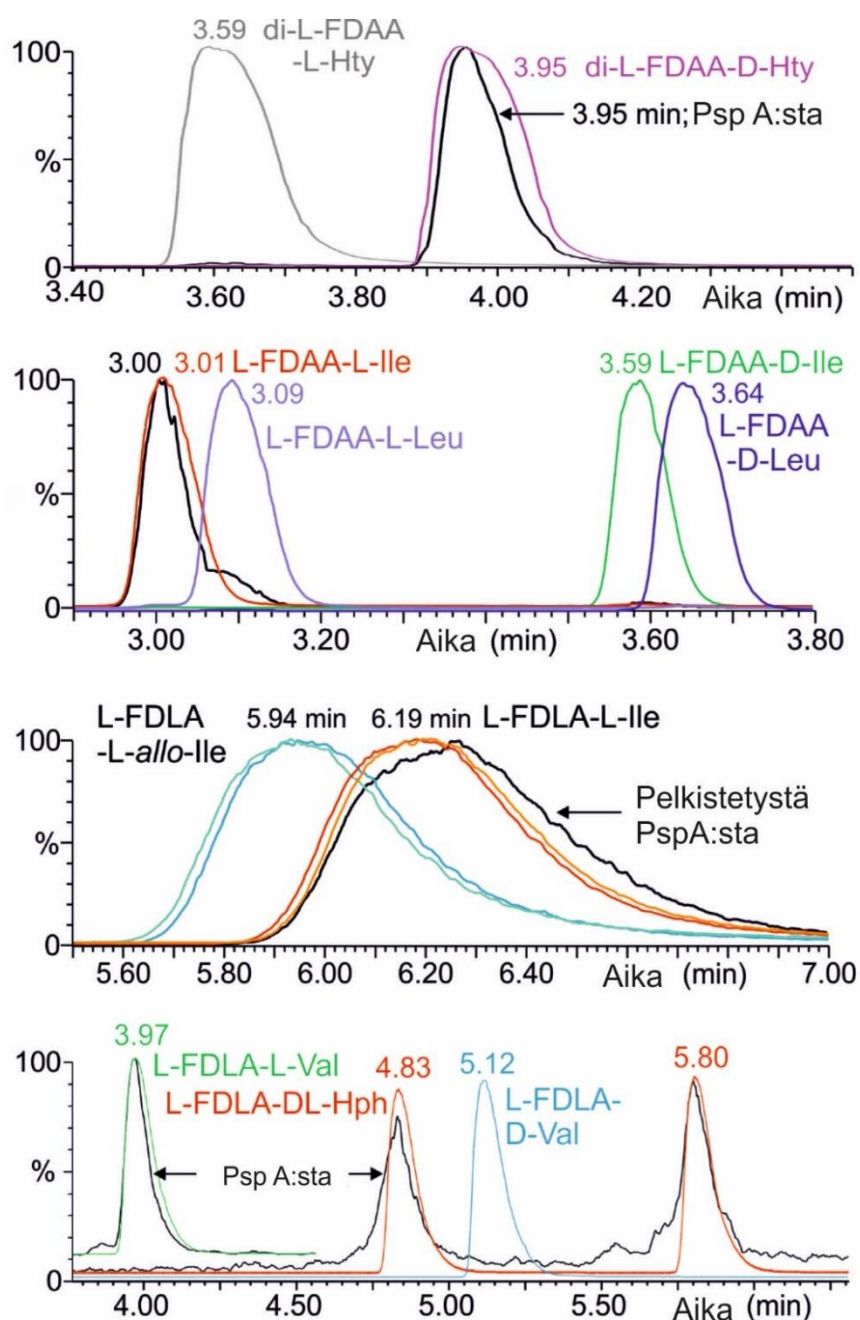
1:50 laimennoksen tuloksen perusteella voidaan sanoa, että näytteessä oli 4,5 μg nodulariinia grammassa kylmäkuivattuja soluja.

4.5. Tetrapeptidin rakenteen selvittäminen LC-MS tekniikalla

Puhdistettu yhdiste lähetettiin NMR-analyysiin, jonka suorittivat Esa Haapaniemi ja Perttu Permi Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella. Analyysissä todettiin

tuotteen puhtauden riittävän analyysin tekemiseen. NMR-analyysi vahvisti massaspektrometrillä saadut tulokset. Yhdisteen nimeksi päätettiin antaa pseudospumigiini, sillä rakenteeltaan se muistuttaa hyvin paljon spumigiiniä samaan tapaan kuin pseudoaeruginosiini muistuttaa aeruginosiinia. Pseudoaeruginosiineilla ei ole kolmantena aminohappona aeruginosiineille tyypillinen Choi, kun taas pseudospumigiinilla ei ole kolmantena aminohappona spumigiineille tyypillinen Pro tai mPro, rakenteiden vastatessa muuten toisiaan.

Vertaamalla Marfey-derivoitujen standardiaminohappojen LC-massaspektrometrillä saatuja retentioaikoja hydrolysoidusta näytteestä saatujen vastaavien happojen retentioaikoihin saatiin tietoa pseudospumigiinin aminohappokoostumuksesta. Kuva 13 näyttää näytteen retentioaikojen suhteen standardimolekyyliin, joita vertaamalla pääteltiin näytteessä olleet molekyylit. Taulukko 6 kertoo kunkin pseudospumigiinivariantin 2. ja 3. aminohapon.

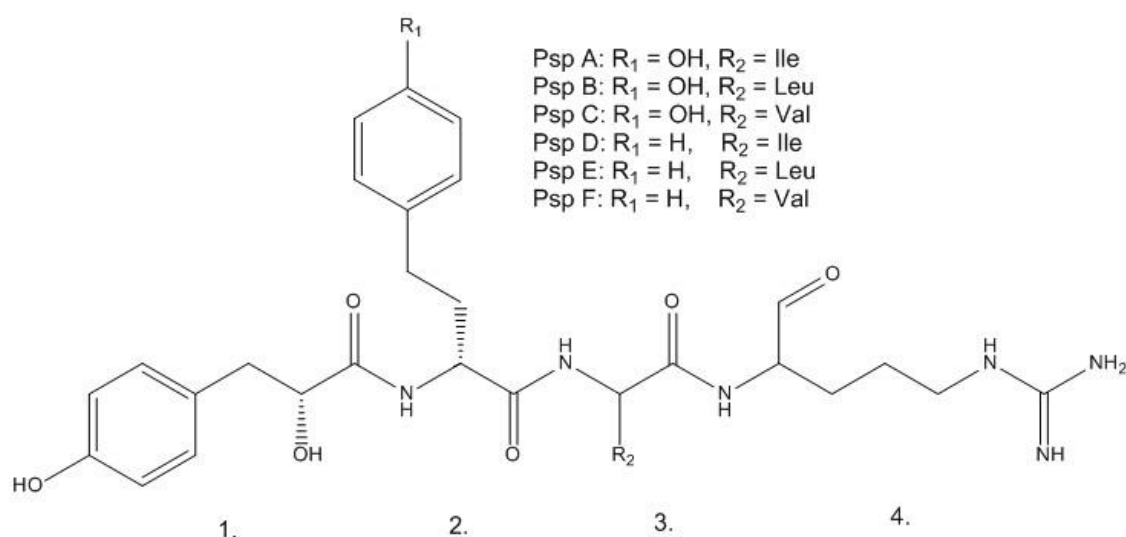


Kuva 13. Aminohappostandardien ionikromatogrammit yhdistettynä pseudospumigiininäytteen kromatogrammeihin. (Jokela ym. 2017)

Pseudospumigiinista löydettiin kuusi muotoa A, B, C, D, E ja F. Eri varianttien aminohappojärjestys on esitetty taulukossa 6 ja molekyyli kuvattu kuvassa 14.

Taulukko 6. Pseudospumigiinivarianttien aminohappojärjestys, massa ja variantin osuus tuotteesta.

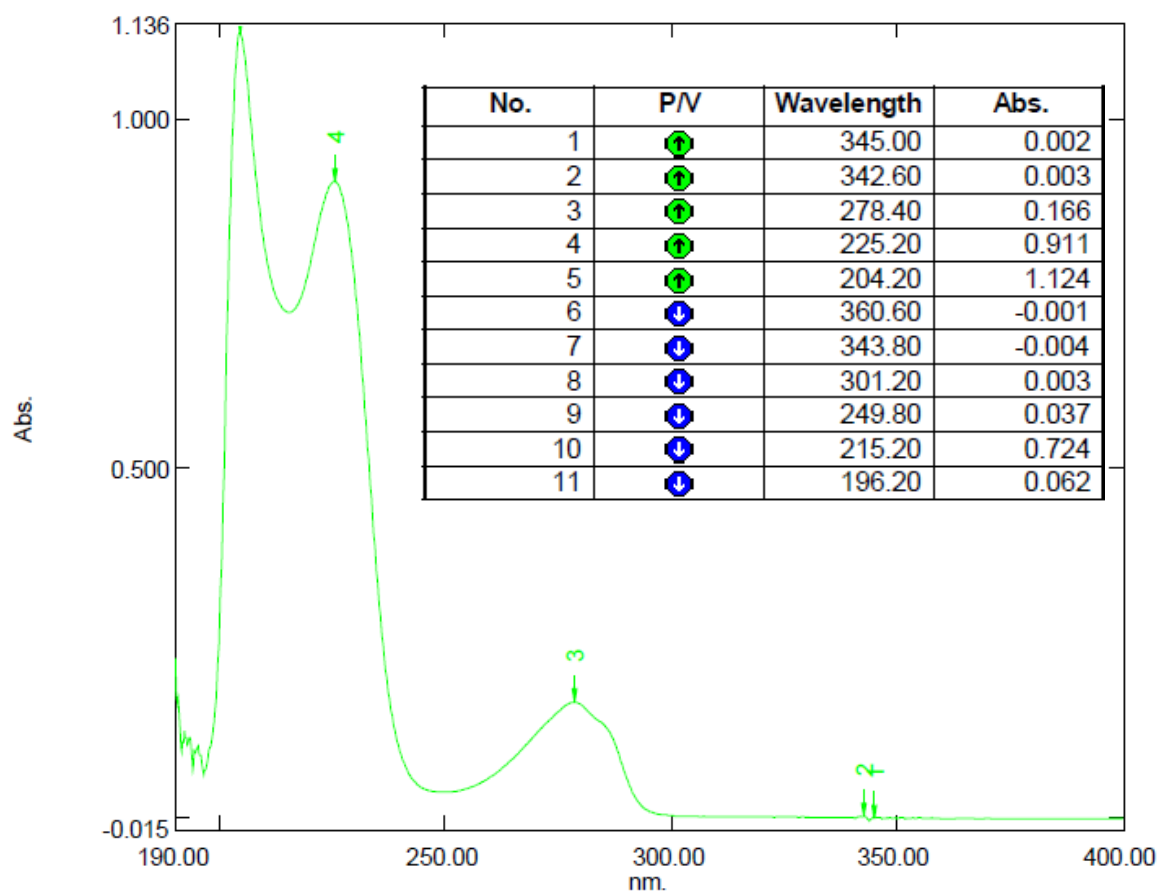
Variantti	1.	2.	3.	4.	m/z [M+H] ⁺	%
Pseudospumigiini A	Hpla	D-Hty	L-Ile	Argininaali	613,4	81
Pseudospumigiini B	Hpla	Hty	L-Leu	Argininaali	613,4	9
Pseudospumigiini C	Hpla	Hty	L-Val	Argininaali	599,4	5
Pseudospumigiini D	Hpla	Hph	Ile	Argininaali	597,4	4
Pseudospumigiini E	Hpla	Hph	Leu	Argininaali	597,4	<1
Pseudospumigiini F	Hpla	Hph	Val	Argininaali	583,3	<1



Kuva 14. Pseudospumigiinivarianttien kemiallinen rakenne.

4.6. Pseudospumigiinin UV-spektri

Pseudospumigiininäytteelle tehtiin spektrofotometrianalyysi aallonpituuksilla 190 nm – 400 nm, tulos kuvassa 15.



Kuva 15. Pseudospumigiinin UV-spektri

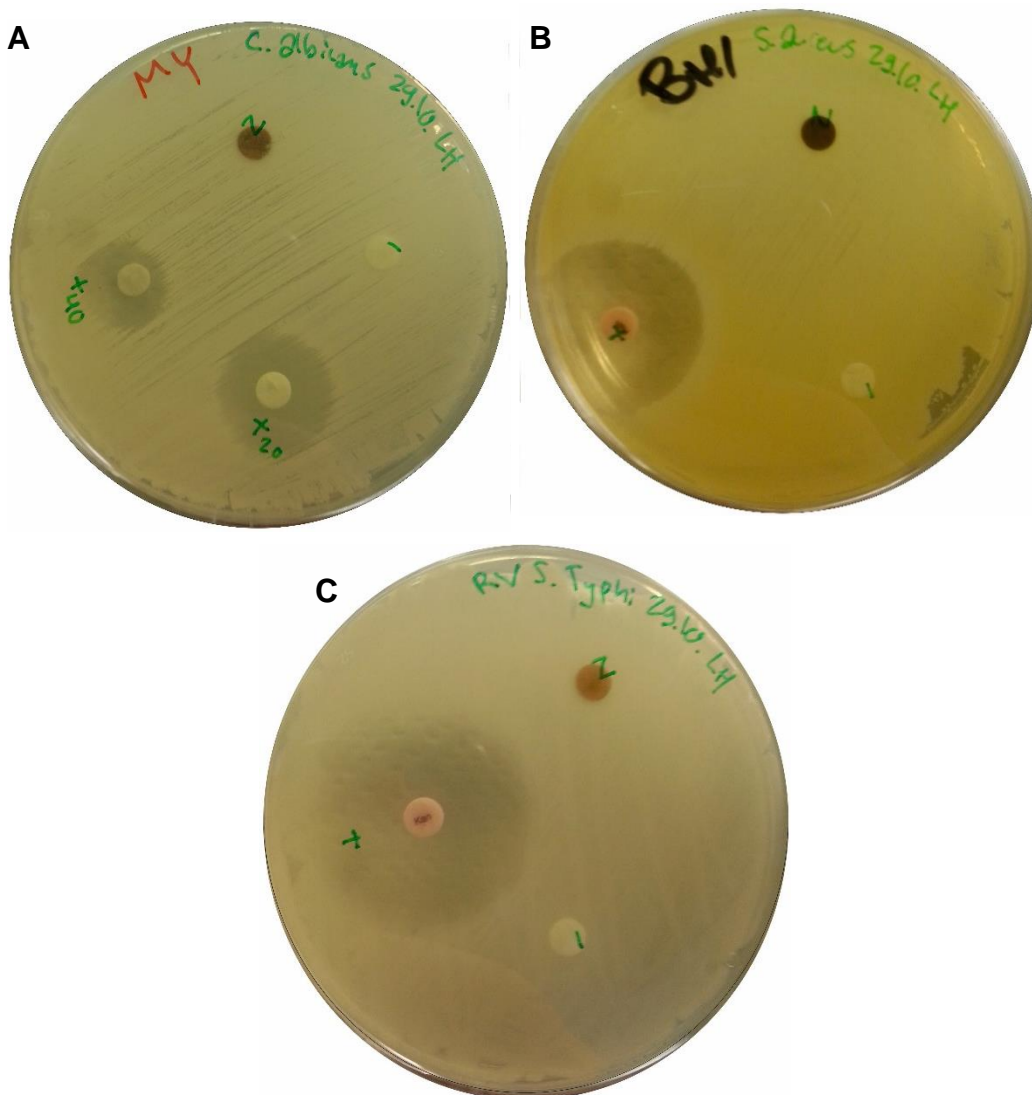
4.7. Kantojen seulonta massaspektrometrillä

Nostoc sp. CENA543-bakteerin eristyspaikan lähialueelta eristetyistä muista syanobakteereista haluttiin selvittää, tuottavatko ne samoja bioaktiivisia yhdisteitä, kuin *Nostoc* sp. CENA543. Kantojen soluista tehtiin metanoliuutteet, jotka analysoitiin massaspektrometrillä.

Q-TOF-MS ajoissa *Nostoc* sp. CENA543-kannan lisäksi *Nostoc* sp. CENA544-kannasta löytyi nodulariinia, pseudospumigiinia sekä anabaenopeptiineja. Muista kannoista yhdisteitä ei löytynyt. *Nostoc* sp. CENA535 kannan uutteesta löytyi mielenkiintoisia ioneja noin 1200 Da kokoisesta peptidistä. *Nostoc* sp. CENA543:n uutteen massaspektrit vastasivat odotettuja tuloksia pseudospumigiinin, nodulariinin ja anabaenopeptiinien suhteen.

4.8. *Nostoc* sp. CENA535 -kannan kiekkodiffuusiotesti maljoilla

Nostoc sp. CENA535 – kannan massaspektrometrianalyysissä löydettiin mielenkiintoisia yhdisteitä. Tämän johdosta päätettiin kokeilla kannasta tehdyn metanoliuutteen bioaktiivisuutta bakteerien tai sienien kasvua estävien yhdisteiden varalta. Kannasta tehty uute ei estänyt muiden bakteerien tai sienien kasvua kiekkodiffuusiotestissä (Kuva 16).



Kuva 16. *Nostoc* sp. CENA535-kannan kiekkodiffuusiotestit. Maljoilla nähdään positiivisten kontrollikiekkojen aiheuttamat estovyöhykkeet, mutta soluista saatujen näytteiden (N) ympärillä ei ole estovyöhykkeitä. A: *Candida albicans*

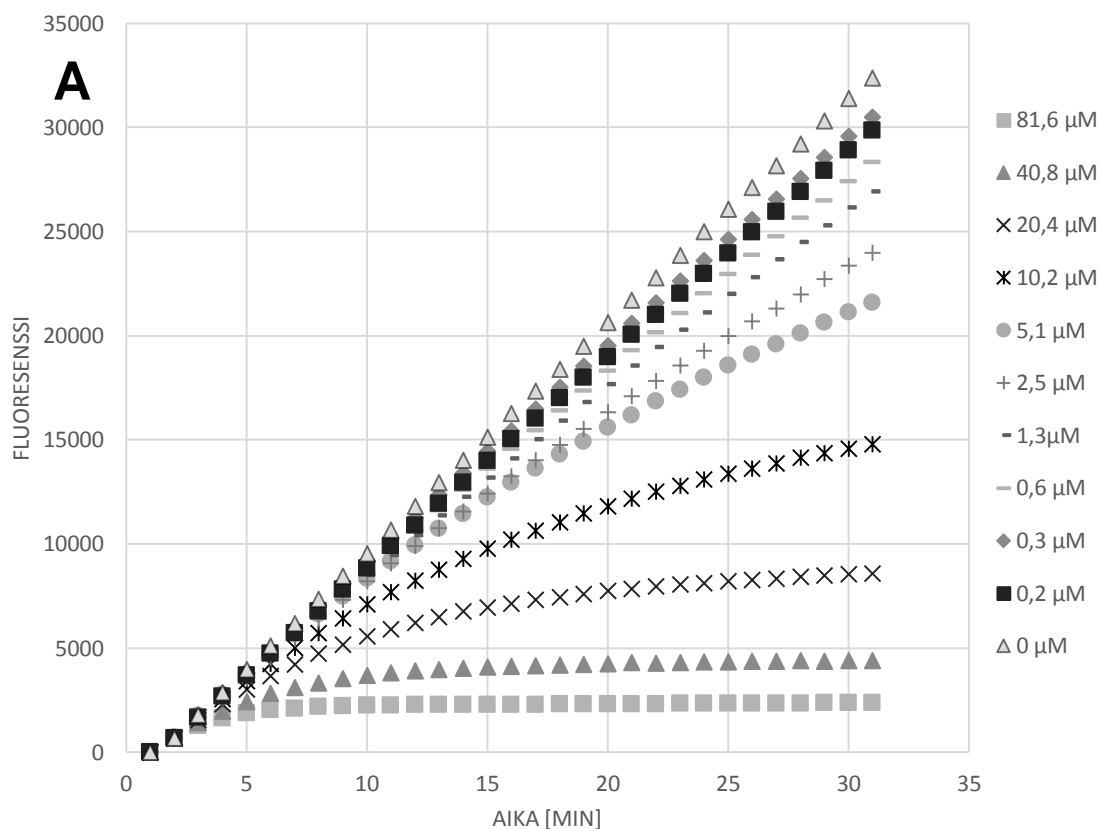
HAMBI261, positiivisena kontrollina nystatiini, B: *Staphylococcus aureus*

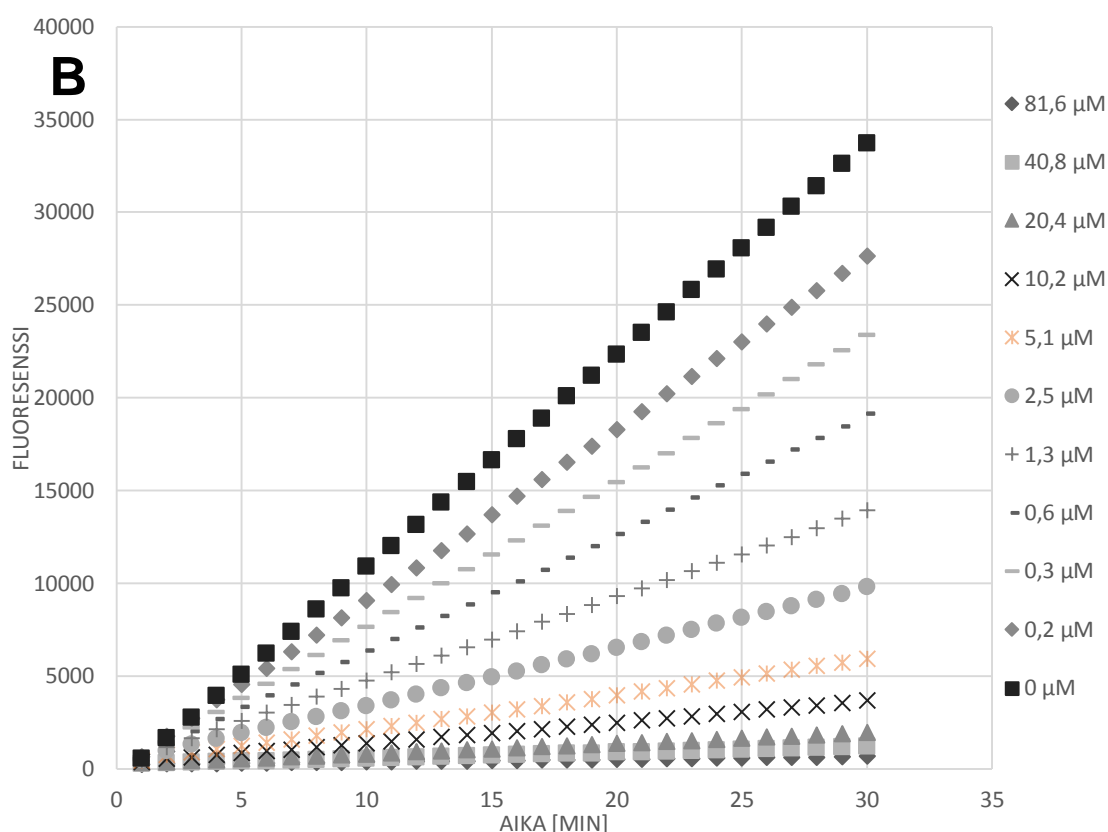
HAMBI166, positiivisena kontrollina kanamysiini C: *Salmonella typhi*

HAMBI1306, positiivisena kontrollina kanamysiini.

4.9. Pseudospumigiinin trypsiini-inhibitio

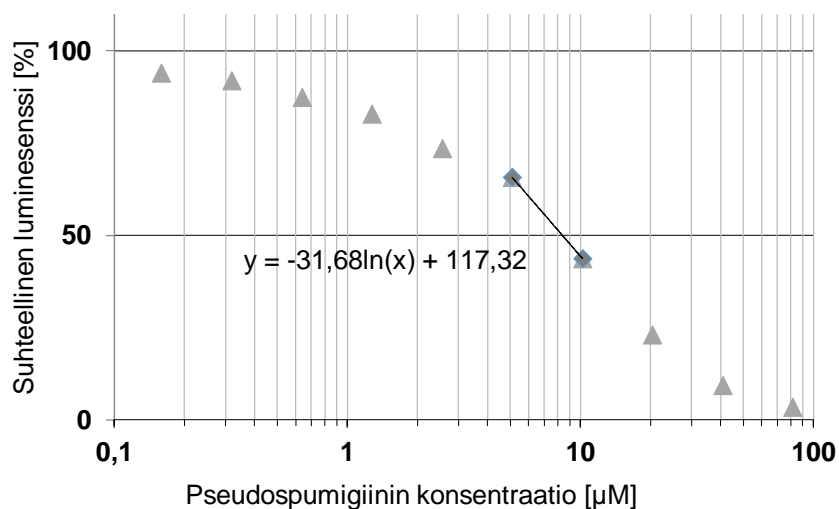
Pseudospumigiinin rakenteen samankaltaisuus spumigiinin kanssa antoi olettaa niillä olevan samankaltaista bioaktiivisuutta. Spumigiini E:n tiedettiin toimivan trypsiini-inhibiittorina (Fewer ym. 2009). Pseudospumigiinin trypsiini-inhibitio aktiivisuutta testattiin kokeella, jossa trypsiinin hajotessa syntyi fluoresoiva tuote, jonka luminesenssia mittaamalla pystyttiin seuraamaan entsyymireaktion nopeutta eri inhibiittoripitoisuuksilla.





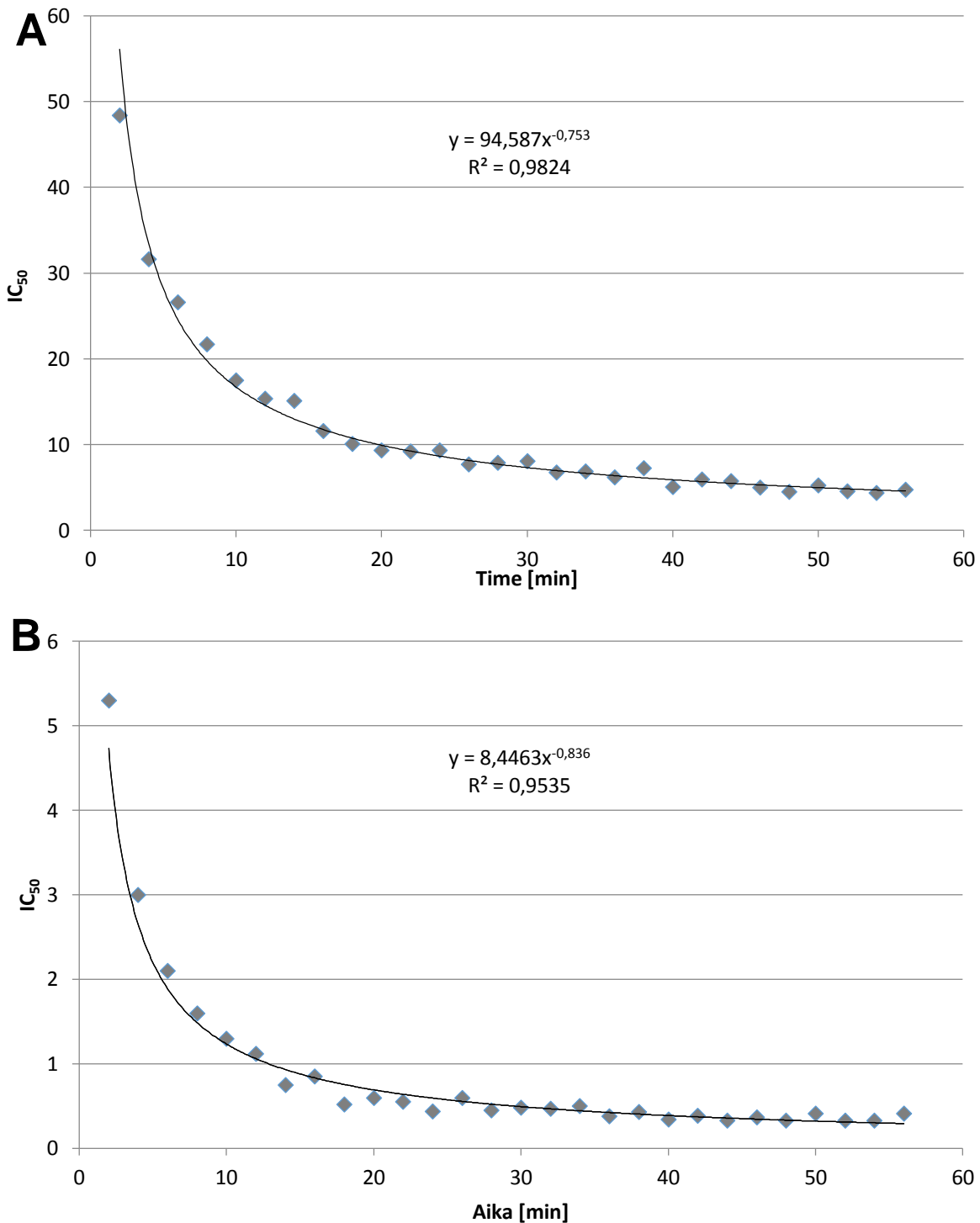
Kuva 17. Entsyymiaktiivisuus eli hydrolyysituotteen muodostuminen (fluoresenssi) ajan (min) suhteen A: pseudospumigiinipitoisuuksilla B: leupeptiinipitoisuuksilla.

Pseudospumigiinin inhiboidessa trypsiiniä entsyymiaktiivisuuden muutos ajan suhteen ei ollut lineaarinen (Kuva 17) vaan entsyymiaktiivisuus heikkeni kullakin pseudospumigiinikonsentraatiolla ajan funktiona. Suurimmalla pseudospumigiinikonsentraatiolla reaktio alkoi lähes yhtä nopeasti kuin muillakin konsentraatioilla, mutta miltei pysähtyi noin kuuden minuutin kuluttua reaktion alkamisesta. Tunnettu trypsiini-inhibiittori leupeptiini käyttäytyi toisella tavalla. Leupeptiinikonsentraation kasvaessa reaktio hidastui, mutta nopeus pysyi vakiona tuotteen määrän kasvaessa lineaarisesti. Pseudospumigiinille ei voitu suoraan lukea IC_{50} -arvoa näistä tuloksista reaktionopeuden muuttuessa. Nopeuden arvo tulisi määrittää lineaarisesti kasvavan suoran kulmakertoimen mukaan, mutta tuloksien ollessa laskevia käyriä kulmakerrointa ei voitu näin määrittää.



Kuva 18. Pseudospumigiinin entsyymiaktiivisuuden IC_{50} määritettynä kuvaajasta.

Arvo päätettiin määrittää piirtämällä trendiviiva reaktion tuloksista, käyttäen kukin konsentraation maksimiluminesenssiä (Kuva 18) ja näin saatua kulmakertoimen käytettiin arvon määrittämiseen. Kulmakertoimen funktioon $y = -31,68\ln(x) + 117,32$ sijoittamalla arvo $y=50$ saatiin IC_{50} arvoksi 8,373. Leupeptiinin arvo oli 0,803. Pseudospumigiinille ja spumigiinille määritettiin myös IC_{50} eri ajan hetkinä (Kuva 19).



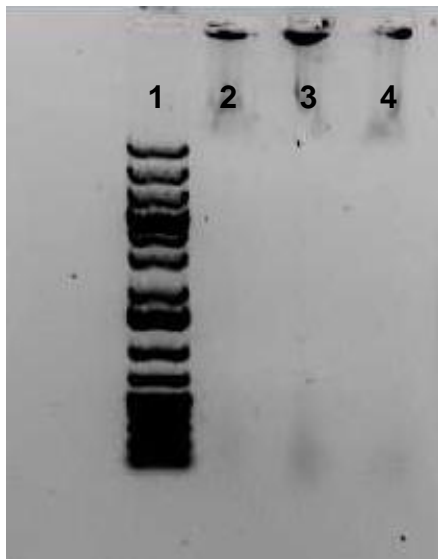
Kuva 19. A: Pseudospumigiinin ja B: spumigiini E:n (Fewer ym. 2009) IC_{50} muutos ajan funktiona. Pseudospumigiinille määritettiin myös mittaushetkikohtaiset IC_{50} , jolloin entsyymiaktiivisuus laskettiin kahden perättäisen mittauspisteen, joiden ajallinen ero oli 2 min, välisestä muutoksesta.

4.10. Geenien analyysi

4.10.1. DNA:n eristyksen tulos

Nostoc sp. CENA543-soluista eristettiin DNA koko genomien sekvensointia varten. DNA:n puhdistuksessa jouduttiin käyttämään kahta eri menetelmää, sillä DNA:n puhtauden kanssa kohdattiin ongelmia, jolloin päädyttiin vaihtamaan menetelmää. Molempien menetelmien tulokset on kuvattu tässä osiossa.

Ensin kuvatulla menetelmällä DNA:ta saatiin eristettyä, mutta sen mukana tuli huomattavasti epäpuhtauksia, ilmeisesti polysakkarideja, jotka häiritsivät DNA:n ajamista geelillä, näytteen jäädessä kaivoihin tai ajautuessa geelillä hyvin epätasaisesti jättäen tahroja geelikuvaan (kuva 20).



Kuva 20. Eristetty DNA elektroforeesigeelillä. Kaivoissa: 1. Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 2-4. *Nostoc* sp. CENA543.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
cena543 1	Default	1.2.2016	15:21	36,50	0,730	0,369	1,98	1,20	50,00	230	0,609	0,176
cena543 2	Default	1.2.2016	15:22	7,71	0,154	0,084	1,84	0,81	50,00	230	0,191	0,040
cena543 4	Default	1.2.2016	15:24	21,64	0,433	0,256	1,69	0,79	50,00	230	0,548	0,252
cena543 3	Default	1.2.2016	15:26	2,38	0,048	0,028	1,68	0,45	50,00	230	0,105	0,065

Kuva 21. Nanodrop-tulokset DNA:n eristyksestä.

Nanodrop on spektrofotometri, joka mittaa näytteen absorbanssin, ja antaa lukeman alionpituuksille 230 nm, 260 nm ja 280 nm. Aallonpituuksien suhde 260/280 kertoo näytteen puhtaudesta, 260 nm absorbanssin vastatessa näytteessä olevaa DNA:n määrää ja 280 epäpuhtauksista, jotka voivat olla RNA:ta, proteiineja tai esimerkiksi fenolia. Luku 260/230 kertoo DNA:n määrän suhteesta muihin epäpuhtauksiin, esimerkiksi hiilihydraatteihin. Arvon 260/280 tulisi puhtaassa DNA näytteessä olla 1,8 ja 260/230 tulisi puhtaassa näytteessä olla 2,0-2,2. Näytteistä saadut tulokset alittivat nämä rajat huomattavasti, mikä on merkki epäpuhtauksista ja alhaisesta DNA:n määrästä (Kuva 21).

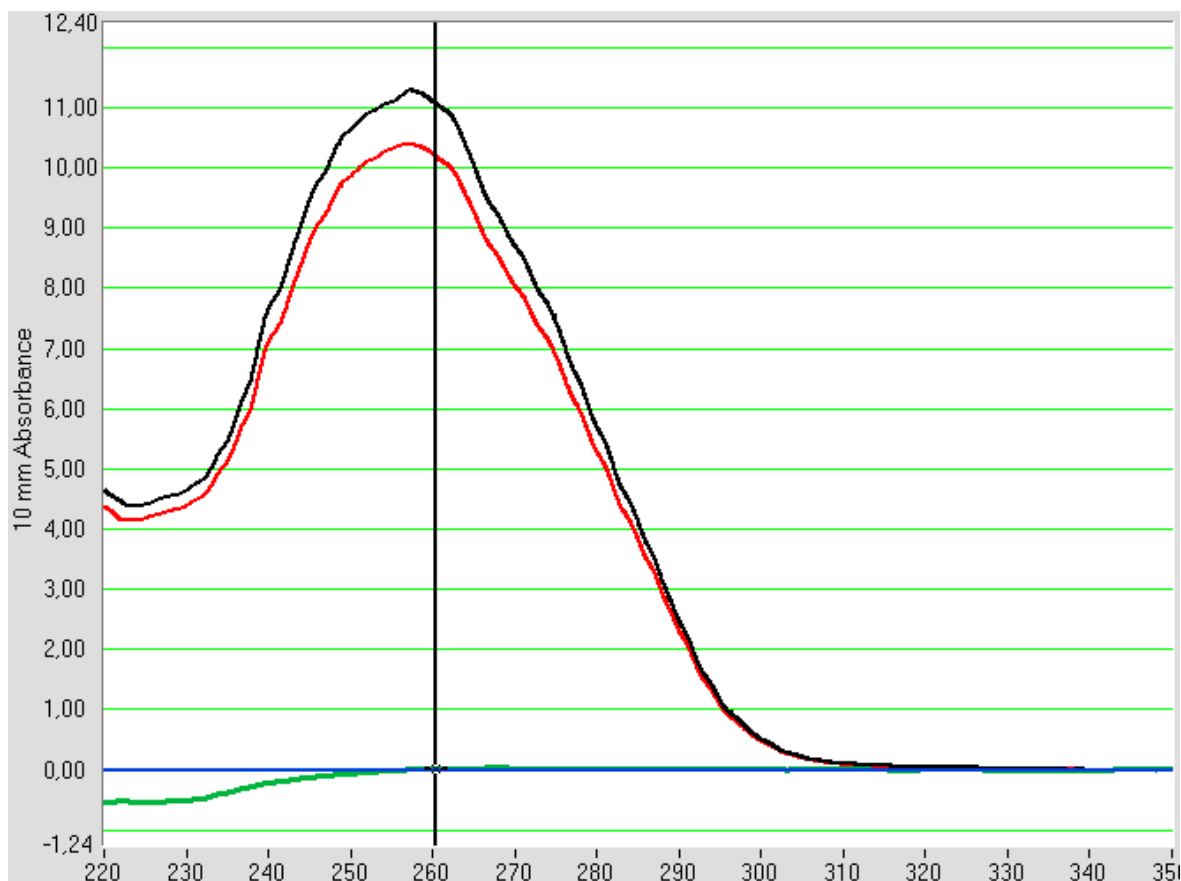
Kun DNA:n eristys toistettiin CTAB-menetelmällä käyttäen suolaisella kasvualustalla kasvatettuja soluja, jossa limaa tuotettiin vähemmän, eristys onnistui paremmin. Kuvassa 22 nähdään näytteen muodostavan siistin juovan geelille, eikä tahroja tai kaivoon jääneitä epäpuhtauksia näy. Näytteen ajautumismatka geelillä vastaa koko genomin DNA:n oletettua pituutta, sen jäädessä pisimmän 20 000 bp standardi juovasta jälkeen. Kuvan 23 Nanodrop-mittauksen tulokset osoittavat myös näytteen puhtaudesta kertovien 260/280 ja 260/230 arvojen olevan reilusti puhtaaksi luokiteltavien arvojen yläpuolella. Tuloksista piirretty kuvaaja vastaa puhtaan DNA:n kuvaajaa (kuva 24).



Kuva 22. Kaivo 1: Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Kaivo 2: *Nostoc* sp. CENA543 1 Kaivo 3: *Nostoc* sp. CENA543 2.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
cena543 1	Default	22.2.2016	13:54	555,07	11,101	5,701	1,95	2,39	50,00	230	4,638	0,157
cena543 2	Default	22.2.2016	13:55	511,78	10,236	5,288	1,94	2,34	50,00	230	4,383	0,140

Kuva 23. Nanodrop-mittauksen tulokset CTAB-menetelmällä eristetylle DNA:lle.



Kuva 24. Nanodrop-mittauksen tulos DNA:n puhtaudesta piirrettynä käyräksi.

4.10.2. Sekvensointi ja sekvenssitiedon kokoaminen

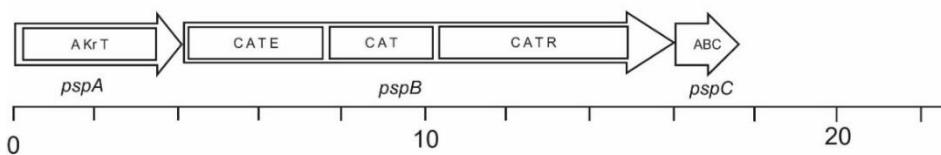
Eristetty DNA lähetettiin Macrogenille sekvensoitavaksi. DNA:sta valmistettiin geenikirjasto Illumina TruSeq PCR Free 350 bp menetelmällä ja sekvensointi tehtiin Illumina HiSeq2000 laitteistolla 100 syklin paired ends -ajolla. Sekvenssin aukot suljettiin Macrogenillä käyttäen PCR:ää ja Sanger-sekvensointia. Sekvensoinnin tuloksena Macrogenilta saatiin sekvenssiaineisto, josta koottiin Spades (3.7.1). ja Newbler (3.0) ohjelmilla 67 skaffoldiin jakautunut 7,2 Mb genomi.

4.10.3. Löydetyt geenirykelmät

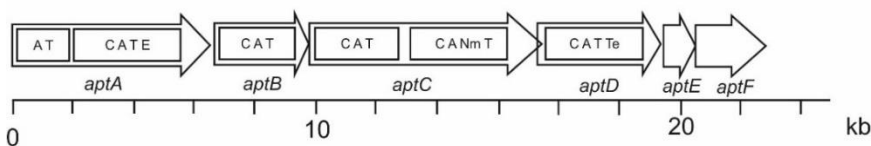
Sekvensoitu ja koottu genomi analysoitiin AntiSMASH-ohjelmalla, joka etsii genomista biosynteesigeenejä vertaamalla syötettyä sekvenssiä tunnettuihin sekundaarimetaboliitteja koodaaviin geeneihin. AntiSMASH-ohjelma löysi genomista yhteensä 20 mahdollista sekundaarimetaboliitin geenirykelmää. Näistä seitsemän vastasi NRPS/PKS -geenejä, joiden tutkimiseen tässä työssä keskityttiin.

Kemiallisen analyysin perusteella tiedettiin kannan tuottavan nodulariinia, pseudospumigiinia ja anabaenopeptiineja. AntiSMASH-tulosten NRPS- ja PKS-moduulien perusteella pystyttiin löytämään näitä proteiineja koodaavat geenirykelmät (Kuva 25) vertaamalla tuloksia tunnettuihin nodulariinin, anabaenopeptiinin ja spumigiinin geeneihin. Neljää muuta rypästä ei pystytty tunnistamaan minkään tunnetun yhdisteen tuottajiksi.

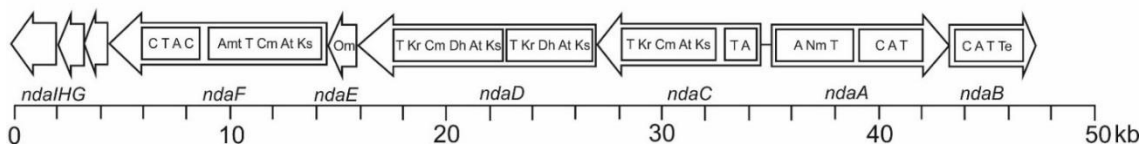
Pseudospumigiinin geenirykelmä *Nostoc* sp. CENA543



Anabaenopeptiinin geenirykelmä *Nostoc* sp. CENA543



Nodulariinin geenirykelmä *Nostoc* sp. CENA543

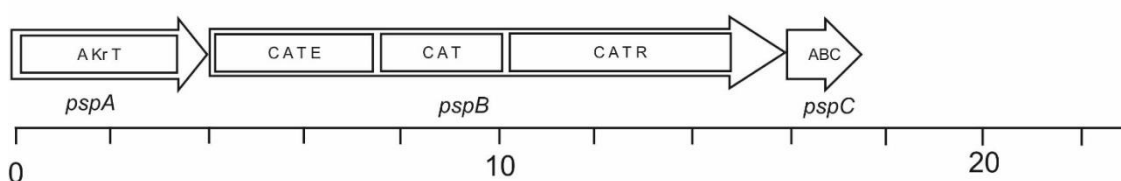


Kuva 25. Genomista löydetyt pseudospumigiinin, nodulariinin ja anabaenopeptiinin geenirykelmät.

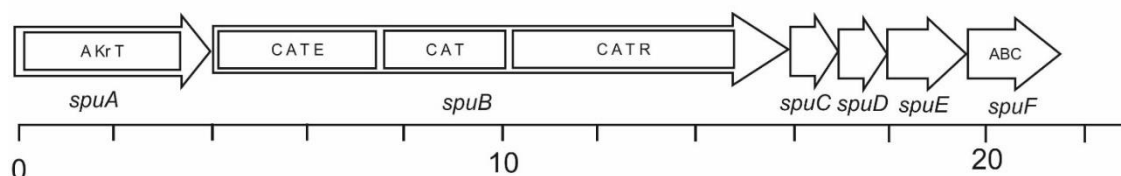
4.10.4. Pseudospumigiini

AntiSMASH tuloksien mukaan kahdessa lukukehyksessä oli spumigiinin geenirykelmän kanssa samankaltainen NRPS-domeenijärjestys (Kuva 26). Pseudospumigiinia tuottavaa rypästä verrattiin BLASTp algoritmilla *Nodularia spumigena* -bakteerin spumigiinin ryppääseen. *pspA* ja *spuA* olivat keskenään 75 % ja *pspB* ja *spuB* olivat keskenään 77 % identtisiä.

Pseudospumigiinin geenirykelmä *Nostoc* sp. CENA543



Spumigiinin geenirykelmä *Nodularia spumigena* CCY9414



Kuva 26. Pseudospumigiinirykelmä *Nostoc* sp. CENA543 ja spumigiinin geenirykelmä *Nodularia spumigena* CCY9414 (Voß ym. 2013). Domeenien lyhenteet: A – adenylaatio, C – kondensaatio, E – epimeraasi, Kr – ketoreduktaasi, T – tiolaatio, R – reduktiaasi.

Molemmat ryppäät sisälsivät samat NRPS domeeneja koodaavat geenit. Myös adenylaatiodomeenien substraatin tunnistusalueet olivat samat lukuunottamatta kolmatta *psp*:n tapauksessa isoleusiinin tunnistavaa domeenia (Taulukko 7). Aminohappoanalyysin perusteella adenylaatiodomeenien spesifiyden tulisi kohdistua seuraaviin hydroksi/aminohappoihin A1: Hpla(hydroksifenyyylimaitohappo) A2: Hph(homofenyylialaniini) A3: Ile(isoleusiini) A4: Arg(arginiini). Aiemmasta

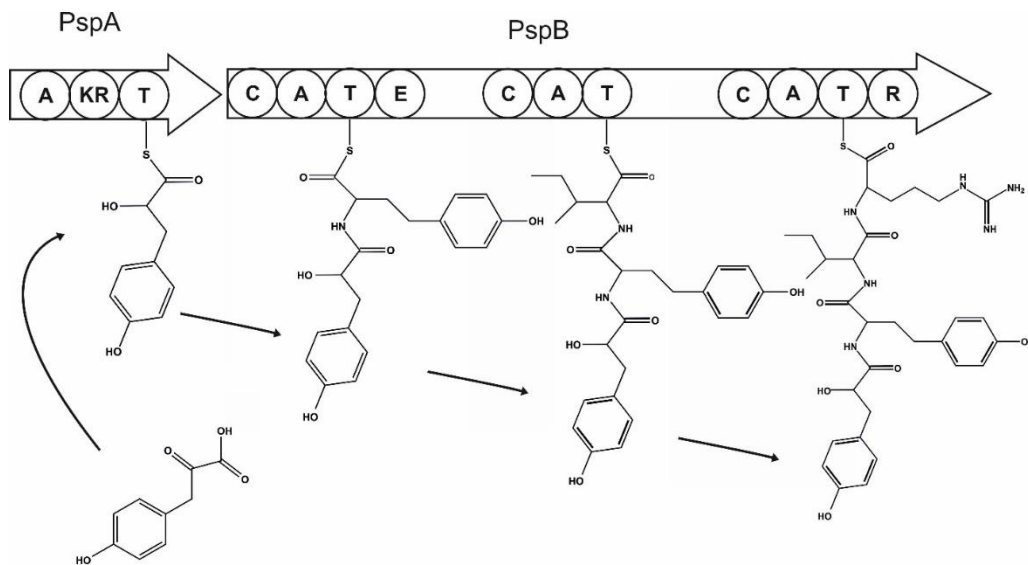
tutkimuksesta (Fewer ym. 2009) tiedetään, että spumigiinivariantteja tuottaa yksi geenirykelmä, joka varioi toista peptidiä homofenyylialaniinin ja homotyrosiinin välillä, sekä neljättä peptidiä arginiinin eri variaatioiden (arginiini, arginoli, argininaali) välillä. Pseudospumigiinin aminohappoanalyysin perusteella psp:n eri variaatioissa samat adenylaatiidomeenit tekevät samaa variointia.

spuA-adenylaatiidomeenin substraattispesifisyys tarkistettiin rinnastamalla geeni CCY9414- kannan spumigiinia koodaavan *spuA*-geenin kanssa BioEdit-ohjelmalla ja lukemalla sitovissa kohdissa oleva aminohapon tunnistava sekvenssi.

Taulukko 7. Pseudospumigiinigeenien adenylaatiidomeenien substraatin tunnistussekvenssit ja niiden aktivoimat substraatit.

Domeeni	Tunnistetut aminohappotähteet	Aktivoitu substraatti
SpuA1	DHAWIAASG	Hpla
PspA1	DHAWIAASG	Hpla
SpuB1	DLAFTGCVTK	Hty
PspB1	DLAFTGCVTK	Hty
SpuB2	DVQFIAHAVK	Pro/mPro
PspB2	DAFFLGVTfK	Ile
SpuB3	DVETTGAfTK	Arg
PspB3	DVETTGAfTK	Arg

Pseudospumigiinin synteesi pitenevän peptidiketjun siirtyessä moduulilta toiselle on kuvattu alla (Kuva 27). Mekanismi toimii samalla tavalla kuin spumigiinin tuotannossa, vain PspB2-adenylaatiidomeenin tunnistaessa eri substraatin.

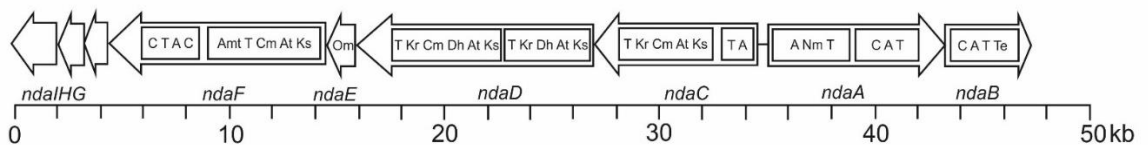


Kuva 27. Pseudospumigiinin biosynteesi.

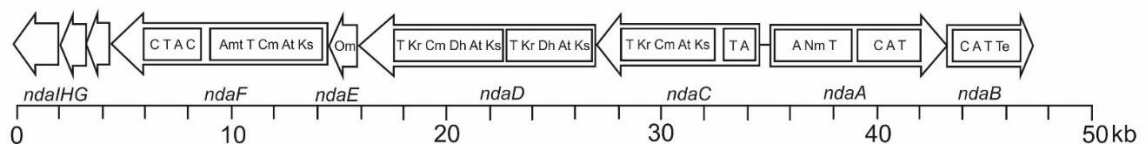
4.10.5. Nodulariini

Nodulariinisynteesin geenirykelmä on tyypillinen nodulariinin tuotantoon sisältäen kaikki geenit, joita nodulariinin synteesiryppäessä on myös *Nodularia spumigena* CCY9414-kannassa. Adenylaati domeeneille ennustetut substraattit ovat myös samat (Kuva 28).

Nodulariinin geeniklusteri *Nostoc* sp. CENA543



Nodulariinin geeniklusteri *Nodularia spumigena* CCY9414

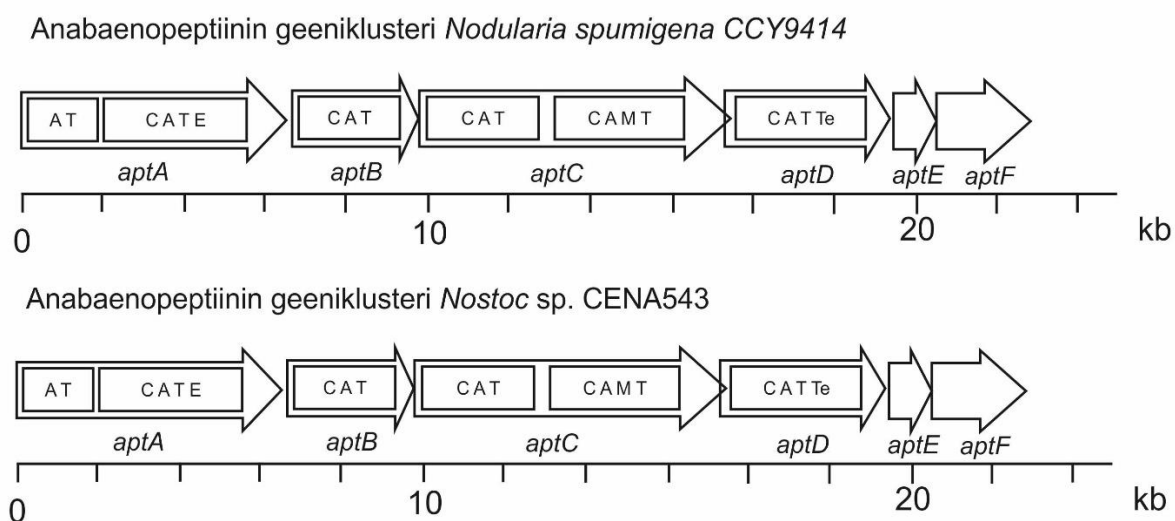


Kuva 28. Nodulariinin geenirykelmä *Nostoc* sp. CENA543 ja *Nodularia spumigena* CCY9414 (Voß ym. 2013). Domeenien lyhenteet: A – adenylaatio, Amt – aminotransferaasi, At – asyylitransferaasi, C – kondensaatio, Cm – C-metyy-

litransferaasi, Dh – dehydrataasi, E – epimeraasi, Kr – ketoreduktaasi, Ks – ketosyntetaasi, Nm – N-metyylitransferaasi, Om – O-metyylitransferaasi, T – tiolaatio, Te – tioesteraasi.

4.10.6. Anabaenopeptiinit

Anabaenopeptiinisynteesin geenirykelmä on tyypillinen anabaenopeptiinien tuotantoon sisältäen kaikki geenit, joita anabaenopeptiinien synteesiryppäessä on myös *Nodularia spumigena* CCY9414-kannassa. Adenylaati domeeneille ennustetut substraattit ovat myös samat (Kuva 29).



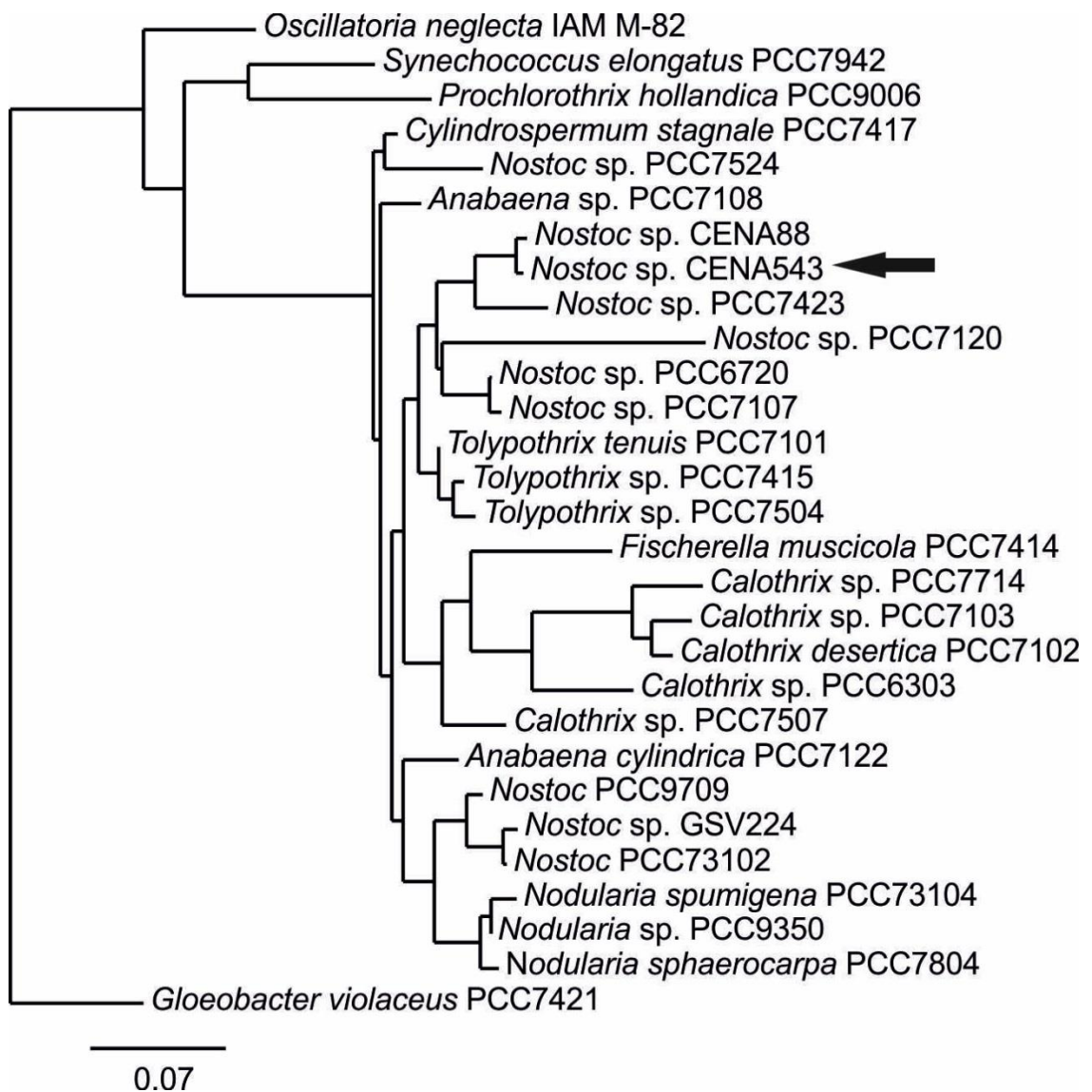
Kuva 29. Anabaenopeptiiniin geenirykelmä *Nostoc* sp. CENA543 ja *Nodularia spumigena* CCY9414 (Voß ym. 2013). Domeenien lyhenteet: A – adenylaatio, C – kondensaatio, E – epimeraasi, M – N-metyylitransferaasi, T – tiolaatio, Te – tioesteraasi.

4.10.7. Tuntemattomat geeniryppäät

Muille neljälle NRPS-ryppäälle ei löydetty luotettavaa samankaltaisuutta tietokannasta eikä tuotteita pystytty päättämään pelkän genomitiedon pohjalta.

4.10.8. *Nostoc* sp. CENA543 –bakteerin fylogenia

Nostoc sp. CENA543 –bakteerille piirrettiin sukupuu käyttäen sen ja muiden syanobakteerien 16S rRNA –sekvenssejä (Kuva 30). Fylogeneettisestä puusta nähdään *Nostoc* sp. CENA543 –kannan ryhmittyneen *Nostoc*-rykelmä 3:een kuuluvien bakteerien kanssa samaan haaraan (Herdman ym. 2015). Nodulariinia tuottavia *Nodularia*-suvun bakteereja esiintyy omassa haarassaan.



Kuva 30. 16S rRNA:ta koodavan DNA:n sekvenssin perusteella rakennettu evoluutiopuu.

5. Tulosten tarkastelu

Tämän työn tarkoituksena oli *Nostoc* sp. CENA543 -kannan tuottamien bioaktiivisten yhdisteiden biosynteesi reittien ja rakenteiden selvittäminen. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää uutena löydetyn peptidiryhmän, pseudospumigiinien, trypsiini-inhibitioaktiivisuus.

5.1. Pseudospumigiinien biosynteesi ja rakenne

Pseudospumigiinit ovat spumigiineja, aeruginosiineja ja pseudoaeruginosiineja läheisesti muistuttava peptidiryhmä, joka eroaa edellä mainituista kolmannen aminohapon perusteella, joka PSP:llä on isoleusiini tai leusiini tai valiini. Spumigiineilla tämä aminohappo on proliini tai metyyliproliini (Fewer ym. 2009) ja aeruginosiineilla kolmas aminohappo on aina Choi (Ersmark ym. 2007). Aeruginosiineilla toinen aminohappo on leusiini, isoleusiini, fenyyialaniini, tyrosiini tai homotyrosiini, kun pseudospumigiinilla se on Hty tai Hph. Pseudospumigiini on rakenteeltaan enemmän spumigiinin kuin aeruginosiinin kaltainen ja siksi nimeksi valittiin pseudospumigiini. Tämä rakenneyhtäläisyys antaa olettaa, että pseudospumigiinillakin olisi vastaavanlaisia entsyymi-inhibitio-ominaisuuksia kuin spumigiinilla, aeruginosiinilla ja pseudoaeruginosiinilla (Liu ym. 2015). Tämä oletus osoittautui oikeaksi, joka yhdessä sen kanssa, että pseudospumigiineja ei ole ennen dokumentoitu, laajentaa lyhyiden, lineaaristen seriiniproteaasi-inhibiittoreiden rakenteellista monimuotoisuutta.

Spumigiinin ja pseudospumigiinin geenejä tutkittaessa huomataan, että molemmissa geenirykelmissä on toisiaan vastaavat *pspA/spuA*, *pspB/spuB* ja *pspC/spuF* geenit (Fewer ym. 2009). Spumigiiniryppään *SpuC*, *spuD* ja *spuE* puuttuvat pseudospumigiinin geenirykelmästä (Kuva 26). Spumigiinin synteesissä nämä geenit vastaavat yhdisteeseen tarvittavan metyyliproliinin tuottamisesta. Pseudospumigiinin rakenteeseen metyyliproliini ei kuulu, joten siltä puuttuvat kyseiset geenit. Voi olla, että metyyliproliinia tuottavien geenien deleetio on johtanut *pspB*-geenin mutaatioon, jossa adenylaati domeeni on koodattu tunnistamaan metyyliproliinin sijaan isoleusiini. Toisaalta on mahdollista, että

adenylaatiodomeenin mutaatio on tapahtunut ensin tunnistamaan isoleusiini, jonka jälkeen tarpeettomat metyyliproliinia tuottavat geenit ovat hävinneet.

Spumigiinin ja pseudospumigiinin rakenteessa esiintyy variaatiota toisessa ja neljännessä aminohapossa muutaman toisiaan muistuttavan aminohapon kesken: toisessa Hty/Hph ja neljännessä Arg/al/ol (Fewer ym. 2009). Variaatioiden kesken vallitsee kuitenkin yksi muoto jota on yli 80 % kaikesta tuotetusta yhdisteestä. Toisen aminohapon kohdalla voidaan päätellä tämän selittyvän adenylaatiodomeenin epäspesifisyydellä. Arginiinin kohdalla pseudospumigiinissa yhdisteessä oli käytännössä aina argininaali. Argininaali syntyy biosynteesissä reduktasientsyymien pelkistäessä arginiinin karboksyyliyhdyntymän aldehydiksi. Spumigiineissa aldehydi saattaa vielä pelkistyä alkoholiksi (argininoli) entsyymaattisesti tai spontaanissa reaktiossa (Fujii ym. 1997A)

5.2. Nodulariinin tuotanto

Työssä todettiin, että *Nostoc* sp. CENA543-kannasta saatiin eristettyä nodulariinia ja sen tuotantoon vaadittavat geenit löytyvät kannan genomista. Nodulariinin tuotanto oli huomattavasti korkeampi kuin aiemmin löydetyillä nodulariinia tuottavilla *Nostoc* -kannoilla (Gehring ym. 2012, Liaimer ym. 2016), selvästi suurempi kuin uudella *Iningainema pulvinus* -kannalla (McGregor & Sendall 2017) ja suurempi kuin joillakin *Nodularia*-kannoilla (Mazur-Marzec ym. 2013). Tämä tutkimus yhdessä edellä mainittujen löytöjen kanssa osoittaa, että nodulariinin tuotanto ei ole yksinomaan *Nodularia* -suvun ominaisuus ja että muutkin tuottavat sitä myrkyllisinä pitoisuuksina.

Nostoc -suvun syanobakteerien on aikaisemmin osoitettu tuottavan mikrokystiiniä (Sivonen ym. 1990, Oksanen ym. 2004, Kaasalainen ym. 2012), joka on nodulariinille hyvin läheistä sukua oleva yhdiste (kappale 1.4.5). Mikrokystiinin ja nodulariinin toimintamekanismin ollessa samanlainen ja ajavan samaa käyttötarkoitusta solussa.

5.3. *Nostoc* sp. CENA543 muut geenit, evoluutio ja fylogenia

Nodulariini, spumigiini ja anabaenopeptiini ovat kaikki *Nodularia* –suvun kannoille tyypillisiä tuotteita, ja *Nostoc* sp. CENA543 tuottaa nodulariinia, spumiginiä geneettisesti muistuttavaa pseudospumiginiä ja anabaenopeptiiniä (Fujii ym. 1997A). *Nodularia*-bakteerit tuottavat tyypillisesti myös aeruginosiineja (Fewer ym. 2013) tai pseudoaeruginosiineja (Liu ym. 2015). Näitä yhdisteryhmiä ei kuitenkaan löytynyt *Nostoc* sp. CENA543 –bakteereista.

Nodulariinin, pseudospumigiinin ja anabaenopeptiinien geenirykelmien tunnistus onnistui genomitiedon avulla. Pelkkä geneettinen data ei kuitenkaan ole täysin riittävä näiden geenien tuotteiden varmistamiseksi. Täyden varmuuden saamiseksi tuotteet pitää todeta. Geenirykelmät tulisi kloonata toiseen organismiin ja havaita tuotanto uudessa isäntäorganismissa tai vaihtoehtoisesti hiljennää geenit alkuperäisessä organismissa.

Anabaenopeptiiniä löydettiin useampaa varianttia. Anabaenopeptiinivarianttien on raportoitu aiemmin johtuvan adenylaatiidomeenin epäspesifisestä substraatin tunnistuksesta, mutta myös geenirykelmän tuottamista vaihtoehtoisista adenylaatiidomeeneista, jotka sitovat eri substraateja (Rouhiainen ym. 2010). Tässä tapauksessa geenirykelmästä ei löytynyt vaihtoehtoisia adenylaatiidomeeneja, joten varioinnin voi olettaa johtuvan sitoutumisen epäspesifisyydestä.

Nostoc sp. CENA544 asettui 16S rRNA sekvenssin perusteella hyvin lähelle *Nostoc* sp. CENA543-kantaa (Genuario ym. 2017). Näin läheisille sukulaisille samojen yhdisteiden tuottaminen ei ole epätavallista. Samasta näytteenottopaikasta on siis eristetty kaksi samaa tai hyvin samankaltaista bakteeria. Todettiin, että DNA:n eristystä ja genomien tarkastelua ei kannata tehdä, koska mitään uutta ja merkittävää tuskin löytyy.

Löydettyjen tuntemattomien geeniklustereiden toiminnan selvittäminen olisi hyvä lisätutkimuksen aihe.

5.4. *Nostoc* sp. CENA543 -kannan morfologia, kasvu ja limantuotanto

Nostoc sp. CENA543-kannan mikroskooppinen tutkiminen osoitti solujen vastaavan morfologialtaan *Nostoc* –suvun bakteereita, mikä vahvistettiin myös geneettisesti 16S rRNA:n vertailulla.

Suolagradianttikokeen hypoteesina oli, että solut kasvaisivat paremmin korkeammissa suolapitoisuuksissa, sillä kanta oli alun perin eristetty korkean suolapitoisuuden elinympäristöstä, jossa elämiseen sen uskottiin sopeutuneen. Kokeen tulokset eivät kuitenkaan vastanneet odotuksia, suolamäärän lisääntyessä kasvu päinvastoin hidastui. Kokeessa huomattiin myös, että pelkällä Z8X alustalla kasvatetut solut tuottivat paljon limaa, mitä korkeammissa suolapitoisuuksissa ei tapahtunut. Suolagradianttikokeessa käytettiin unialgaalista kantaa. Unialgaalisessa kannassa solut eivät ole puhdasviljelmästä, vaan niillä on seuralaismikrobeja, jotka eivät ole syanobakteereita. Mikroskopoitaessa huomattiin, että Z8X-alustalla seuralaismikrobeja oli näytteessä runsaasti, mutta suola-alustalla niitä ei näkynyt juuri lainkaan.

Myöhemmin kasvatettaessa akseenista (puhdasta) kantaa Z8X-alustalla solut eivät muodostaneet limaa, jota ne tekivät samalla alustalla seuralaisten kanssa. Tästä voidaan päätellä, että kanta tuotti limaa seuralaismikrobien aiheuttaman stressin vuoksi, tai että nämä seuralaismikrobit tuottivat liman ja suolapitoisuuden nostaminen esti seuralaismikrobien kasvun.

Suolapitoisuuden vaikutusta *Nostoc* –suvun bakteerien limantuotantoon on tutkittu aiemminkin. Somaliasta suolaisesta ympäristöstä eristetyllä *Cyanothece* sp. (De Philippis ym. 1993) osoitettiin, että hypersaliinisesta ympäristöstä eristetyt syanobakteerit limantuotanto ei muuttunut oleellisesti lisäätäessä kasvatusalustan suolapitoisuutta, mutta solujen kasvu hidastui. Myöhemmässä tutkimuksessa (De Philippis ym. 2000) tutkittiin 25 eri *Nostoc* –kannan polysakkariidien eritystä teollista tuotantoa varten. Kokeessa ei todettu eroa liman erityksessä NaCl ionivahvuuden muuttuessa välillä 0 – 2.0 mol l⁻¹. Tässä työssä käytetyn Z8XS-alustan ionivahvuus oli 2,1 mol l⁻¹.

Tätä huomiota voisi tulevaisuudessa soveltaa akseenisia kantoja eristettäessä. Suolaa sisältävällä alustalla voitaisiin estää seuralaismikrobien kasvua, jolloin puhtaan näytteen eristäminen olisi helpompaa.

5.5. Pseudospumigiinin trypsiini-inhibitio

Verrattaessa pseudospumigiinin trypsiini-inhibitioista saatua kuvaajaa spumigiini E:n kuvaajaan (Kuva 19) (Fewer ym. 2009) nähdään yhdisteiden käyttäytyvän keskenään samalla tavalla. Inhibitiota mitattaessa pseudospumigiini ja spumigiini käyttäytyvät toisin kuin vertailukohtana ollut leupeptiini, jonka aktiivisuus kasvaa suoraviivaisesti ajan funktiona ja pseudospumigiinin muodostaessa laskevan käyrän ajan funktiona. Tästä pääteltiin, että pseudospumigiini sitoutuu trypsiiniin kovalenttisesti/pseudokovalenttisesti, estäen substraatin pääsyn aktiiviseen kohtaan (Fewer ym. 2009). Entsyymireaktio ei kuitenkaan pysähtynyt täysin missään pseudospumigiinin konsentraatiossa. Tämä voisi johtua pseudokovalenttisesta sitoutumisesta entsyymiin, jolloin substraatti pääsisi välillä reagoimaan entsyymien kanssa. Pseudospumigiini ja spumigiini ovat rakenteeltaan lähes identtiset, mutta niiden inhibitiovahvuudessa on kuitenkin lähes 170-kertainen ero. Tämä selittyy spumigiinin proliinilla, jonka rengasrakenne muuttaa molekyylin rakennetta.

6. Kiitokset

Tämä työ tehtiin Helsingin Yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen tutkimusryhmässä Syanobakteerit, toksiniit ja bioaktiiviset aineet. Tahdon kiittää professori Kaarina Sivosta mahdollisuudesta työskennellä tutkimusryhmässä ja avusta tutkielman kirjallisessa työstämisessä. Dosentti Jouni Jokelaa kiitän massaspektrometrian teoriaan ja käsiteltyjen peptidiryhmien kemiaan perehdyttämisestä ja työn kirjallisesta ohjaamisesta. Opastuksesta kromatografian ja massaspektrometrian parissa kiitän Matti Wahlsteniä. Syanobakteereiden

kanssa työskentelyyn minut alun perin perehdytti Anu Humisto, jolta sain tärkeää apua DNA:n eristyksessä tätä työtä varten. Opetusta bioinformatiikan työkalujen käyttöön ja tulosten tulkitsemiseen tarjosi dosentti David Fewer. Kiitos Lyudmila Saarille työssä käytetyn bakteerikannan puhdistamisesta akseeniseksi. Lopuksi haluan kiittää avopuolisoani Annika Ijästä ja vanhempiani tuesta kirjoitusprosessin aikana.

Tämän työn tuloksista julkaistiin myös vertaisarvioitu tieteellinen artikkeli, kiitos kaikille mukana olleille: Jokela J, Heinilä LMP, Shishido TK, Wahlsten M, Fewer DP, Fiore MF, Wang H, Haapaniemi E, Permi P & Sivonen K. 2017. Production of high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitors pseudospumigins by the Brazilian benthic *Nostoc* sp. CENA543. *Frontiers in Microbiology* 8 (8):1963.

7. Kirjallisuus

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.

Andreote APD, Marcal Vieira Vaz MG, Genuario DB, Barbiero L, Rezende-Filho AT & Fiore MF. 2014. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Journal of Phycology* 50: 675–684.

Bachmann BO & Ravel J. 2009. Chapter 8. Methods for *in silico* prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods in Enzymology* 458: 181–217.

Bergman B, Ran L & Adams DG. 2008. Cyanobacterial–plant symbioses: Signaling and development. Kirjassa: Herrera A ja Flores H (toim.), *The Cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution*. 1. painos. Caister academic press, Norfolk, UK. Sivut 447–468.

Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E & Weber T. 2013. antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Research* 41 (W1): W204–W212.

Bruins AP. 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* 794: 345–357.

Bruno M, Gucci PMB, Pierdominici, Sestili P, Ioppolo A, Sechi N & Volterra L. 1992. Microcystin-like toxins in different fresh-water species of *Oscillatoria*. *Toxicon* 31 (10):1307–1311.

Calteau A, Fewer PD, Latifi A, Coursin T, Laurent T, Jokela J, Kerfeld CA, Sivoonen K, Piel J & Gugger M. 2014. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. *BMC Genomics* 15: 977.

Cane DE & Walsh CT. 1999. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 6: R319–R325.

Carmichael W, Azevedo S, An J, Molica R, Jochimsen E, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR & Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109: 663–668.

Castenholz RW. 2015. General characteristics of the cyanobacteria. E-kirjassa: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. s. 1–23.

Chen Y, Shen D & Fang D. 2013. Nodularins in poisoning. *Clinica Chimica Acta* 425: 18–29.

Christiansen G, Philmus B, Hemscheidt T & Kurmayer R. 2011. Genetic variation of adenylation domains of the anabaenopeptin synthesis operon and evolution of substrate promiscuity. *Journal of Bacteriology* 193: 3822–3831.

Codd G, Morrison L & Metcalf J. 2005. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 264–272.

Cohen Y & Gurevitz M. 2006. *The Cyanobacteria—Ecology, Physiology and Molecular Genetics*. Kirjassa: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH ja Stackebrandt (toim.), *The Prokaryotes*, 4. osa, 3. painos. Springer-Verlag, New York, USA. Sivut 1075–1091.

Coloma SE, Dienstbier A, Bamford DH, Sivonen K, Roine E ja Hiltunen T. 2017. Newly isolated Nodularia phage influences cyanobacterial community dynamics. *Environmental biology* 19 (1): 273–286.

Dailler D, Danon G & Baudoin O. 2015. A general and scalable synthesis of aeruginosin marine natural products based on two strategic C(sp³)—H activation reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 54 (16): 4919–4922.

Dawson RM. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7): 953–962.

De Philippis R, Margheri MC, Pelosi E & Ventura S. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journal of Applied Physiology* 5 (4): 387–394.

De Philippis R, Ena A, Paperi R, Sili C & Vincenzini M. 2000. Assessment of the potential of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Physiology* 12 (3-5): 401–407.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM & Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. 36 (suppl_2): W465–W469.

Dereeper A., Audic S, Claverie JM & Blanc G. 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10: 8.

Dittmann E, Gugger M, Sivonen K & Fewer DP. 2015. Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. *Trends in Microbiology* 23 (10): 642–652.

Ersmark K, Del Valle J & Hanessian S. 2008. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* 47: 1202–1223.

Fewer DP, Jokela J, Rouhiainen L, Wahlsten M, Koskenniemi K, Stal LJ & Sivonen K. 2009. The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Molecular Microbiology* 73: 924–937.

Fewer DP, Jokela J, Paukku E, Österholm J, Wahlsten M, Permi P, Aitio O, Rouhiainen L, Gomez-Saez GV & Sivonen K. 2013. New structural variants of aeruginosin produced by the toxic bloom forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *PLoS ONE* 8 (9): e73618.

Finking R & Marahiel M. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology* 58: 453–488.

Flores E, Muro-Pastoy AM & Meeks JC. 2008. Gene transfer to cyanobacteria in the laboratory and in nature. Kirjassa: Herrera A ja Flores H (toim.), The Cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution. 1. painos. Caister academic press, Norfolk, UK. Sivut 45-58.

Fujii K, Sivonen K, Adachi K, Noguchi K, Sano H, Hirayama K, Suzuki M & Harada K. 1997A. Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: Novel peptides from toxic *Nodularia spumigena* AV1. Tetrahedron Letters 38: 5525–5528.

Fujii K, Ikai Y, Oka H, Suzuki M & Harada K. 1997B. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism. Analytical Chemistry 69: 3346–3352.

Fujii K, Ika Y, Oka H, Suzuki M & Harada K. 1997C. A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Combination of Marfey's Method with Mass Spectrometry and Its Practical Application. Analytical Chemistry 69: 5146–5151.

Gehring MM, Adler L, Roberts AA, Moffitt MC, Mihali TK, Mills TJ, Fieker C & Neilan BA. 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. The ISME Journal 6: 1834–1847.

Genuario DB, Andreote APD, Marçal Viera Vaz MG & Fiore MF. 2017. Heterocyte-forming cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. Molecular Phylogenetics and Evolution 109: 105–112.

Gould SB, Waller RF & McFadden GI. 2017. Plastid evolution. Annual Review of Plant Biology 59: 491–517.

- Halinen K, Jokela J, Wahlsten M & Sivonen K. 2007. Direct evidence for production of microcystins by *Anabaena* strains from the Baltic Sea. *Applied Environmental Microbiology* 73 (20): 6543–6550.
- Harada K, Fujii K, Shimada T & Suzuki M. 1995. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Tetrahedron Letters* 36 (9): 1511–1514.
- Herdman M, Castenholz RW & Rippka R. 2015. *Form-Nostoc*. E-kirjassa: Whitman (toim.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Sivut 1-10.
- Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCF, Ng KF, Suen MWM & Tai HL. 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The clinical biochemist reviews*. 24 (1): 3-12.
- Humisto A, Herfindal L, Jokela J, Karkman A, Bjornstad R, Choudhury RR & Sivonen K. 2015. Cyanobacteria as a source for novel anti-leukemic compounds. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17 (1): 78–91.
- Ishida K, Welker M, Christiansen G, Cadel-Six S, Bouchier C, Dittmann E, Hertweck C & Tandeau de Marsac N. 2009. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 75: 2017–2026.
- Jaarinen S & Niiranen J. 2008. Laboratorion analyysimenetelmät. 5.-6. painos. Edita Prima Oy, Helsinki. 223 sivua.
- Jochimsen E, Carmichael W, An J, Cardo D, Cookson S, Holmes C, Antune MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM & Jarvis WR. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 338: 873–878.

Jokela J, Heinilä LMP, Shishido TK, Wahlsten M, Fewer DP, Fiore MF, Wang H, Haapaniemi E, Permi P & Sivonen K. 2017. Production of high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitors pseudospumigins by the Brazilian benthic *Nostoc* sp. CENA543. *Frontiers in Microbiology* 8 (8):1963.

Kaasalainen U, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Sivonen K & Rikkinen J. 2012. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 5886–5891.

Karlsson K, Sipiä V, Kankaanpää H & Meriluoto J. 2003. Mass spectrometric detection of nodularin and desmethylnodularin in mussels and flounders. *Journal of Chromatography B* 784: 243–253.

Kawabata S, Miura T, Morita T, Kato H, Fujikawa K, Iwanaga S, Takada K, Kimura T & Sakakibara S. 1988. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood –clotting proteases and trypsin. *European Journal of Biochemistry* 172 (1): 17–25.

Knoll AH. 2008. Cyanobacteria and earth history. Kirjassa: Herrera A & Flores H (toim.), *The Cyanobacteria Molecular biology, Genomics and Evolution*. 1. painos. Caister academic press, Norfolk, UK. s. 1–15.

Kotai J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research, Oslo, Norway.

Kolmonen E, Sivonen K, Rapala J & Haukka K. 2004. Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. *Aquatic Microbial Ecology* 36 (3): 201–211.

Lehtimäki J. 2000. Characterisation of Cyanobacterial Strains Originating from the Baltic Sea with Emphasis on *Nodularia* and its Toxin, Nodularin. Väitöskirja.

Helsingin yliopisto, maatalous-metsätieteellinen tiedekunta, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Yliopistopaino, Helsinki 2000. 79 sivua.

Lehtimäki J, Moisander P, Sivonen K & Kononen K. 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic sea cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (5): 1647–1656.

Liaimer A, Jensen JB & Dittmann E. 2016. A genetic and chemical perspective on symbiotic recruitment of cyanobacteria of the genus *Nostoc* into the host plant *Blasia pusilla* L. *Frontiers in Microbiology* 7: 1693.

Lifshits M & Carmeli S. 2012. Metabolites of *Microcystis aeruginosa* bloom material from lake Kinneret, Israel. *Journal of Natural Products* 75: 209–219.

Liu L. 2014. New bioactive secondary metabolites from cyanobacteria. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, maatalous-metsätieteellinen tiedekunta, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Hansaprint, Helsinki 2014. 53 sivua.

Liu L, Budnjo A, Jokela J, Haug BE, Fewer DP, Wahlsten M, Rouhiainen L, Paermi P, Fossen T & Sivonen K. 2015. Pseudoaeruginosins, nonribosomal peptides in *Nodularia spumigena*. *ACS Chemical Biology* 10: 725–733.

Luukkainen R, Sivonen K, Namikoshi M, Färdig M, Rinehart KL & Niemelä SI. 1993. Isolation and identification of 8 microcystins from 13 *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (7): 2204-2209.

Marahiel MA, Stachelhaus T & Mootz HD. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* 97: 2651–2674.

Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song

JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C & Bryant SH. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research* 43, D1:222–226.

Marfey P. 1984. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Research Communications* 49: 591-596.

Mazur-Marzec H, Kaczowska MJ, Blaszczyk A, Akcaalan R, Spoof L & Meriluoto J. 2013. Diversity of peptides produced by *Nodularia spumigena* from various geographical regions. *Marine Drugs* 11: 1–19.

Mazur-Marzec H, Meriluoto J, Pliński M & Szafranek J. 2006. Characterization of nodularin variants in *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea using liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 2023–2032.

McGregor GB & Sendall BC. 2017. *Iningainema pulvinus* gen. nov., sp. nov. (cyanobacteria, Scytonemataceae) a new nodularin producer from Edgbaston reserve, north-eastern Australia. *Harmful Algae* 62: 10–19.

Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E & Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research* 39 (suppl_2): W339–W346.

Moffitt MC & Neilan BA. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Applied Environmental Microbiology* 70 (11): 6353–6362.

Murakami M, Okita Y, Matsuda H, Okino T & Yamaguchi K. 1994. Aeruginosin 298-A, a thrombin and trypsin-inhibitor from the blue-green-alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). *Tetrahedron Letters* 35 (19): 3129–3132.

Neuhof T, Schmieder P, Preussel K, Dieckmann R, Pham H, Bartl F & von Dohren H. 2005. Hassalladin A, a glycosylated lipopeptide with antifungal activity from the cyanobacterium *Hassallia* sp. *Journal of Natural Products* 68 (5): 695–700.

Newman DJ & Cragg GM. 2016. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current “state of play”. *Planta Medica* 82 (9/10): 775–789.

Oksanen I, Jokela J, Fewer DP, Wahlsten M, Rikkinen J & Sivonen K. 2004. Discovery of Rare and Highly Toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. *Applied Environmental Microbiology* 70 (10): 5756–5763.

O'Neil JM, Davis TW, Burford MA & Gobler CJ. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313–334.

Paerl HW & Paul VJ. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46: 1349–1363.

Pearson L, Mihali T, Moffitt MC, Kellmann R & Neilan B. 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8 (5): 1650–1680.

Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M, Rouhiainen L, Vaitomaa J, Börner T & Sivonen K. 2003. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2):568–573.

Rausch C, Weber T, Kohlbacher O, Wohlleben W & Huson DH. 2005. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Research* 33 (18): 5799–5808.

Reasoner DJ & Geldreich EE. 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (1): 1–7.

Reinhart KL, Harada K, Namikoshi M, Chen C & Harvis CA. 1988. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 110: 8557–8558.

Reshef V & Carmeli S. 2002. Schizopeptin 791, a New Anabeanopeptin-like cyclic peptide from the cyanobacterium *Schizothrix* sp. *Journal of Natural Products* 65 (8): 1187–1189.

Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer B, Buikema W, Haselkorn R & Sivonen K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 686–692.

Rouhiainen L, Jokela J, Fewer DP, Urmann M & Sivonen K. 2010. Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). *Chemistry and Biology* 17 (3): 265–273.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA ja Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16 (10): 944–945.

Röttig M, Medema MH, Blin K, Weber T, Rausch C & Kohlbacher O. 2011. NRPSpredictor2—a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Research* 39, suppl_2: 362–367.

Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen AD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, de Marsac NT, Rippka R, Herdman M, Sivonen K, Coursin T, Laurent T, Goodwin L, Nolan M, Davenport KW, Gan CF, Rubin EM, Eisen JA, Woyke T, Gugger & Kerfeld CA. 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (3): 1053–1058.

Shishido TK, Humisto A, Jokela J, Liu L, Wahlsten M, Tamrakar A, Fewer DP, Permi P, Adreote AP, Fiore MF & Sivonen K. 2015. Antifungal compounds from cyanobacteria. *Marine Drugs* 13: 2124–2140.

Shishido TK, Jokela J, Fewer DP, Wahlsten M, Fiore MF & Sivonen K. 2017. Simultaneous production of anabaenopeptins and namalides by the cyanobacterium *Nostoc* sp. CENA543. *ACS Chemical Biology*. Elektroninen julkaisu 21.9.2017

Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J & Niemelä SI. 1989. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (8): 1990–1995.

Sivonen K, Carmichael WW, Namikoshi M, Rinehart KL, Dahlem AM & Niemela SI. 1990. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs

from the filamentous fresh-water cyanobacterium *Nostoc* sp. strain-152. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (9): 2650-2657.

Sivonen K, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R & Reinhart KL. 1992. Isolation and characterization of a variety of microcystins from 7 strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (8): 2495–2500.

Sivonen K ja Börner T. 2008. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. Kirjassa: Herrera A & Flores H (toim.), *The Cyanobacteria Molecular biology, Genomics and Evolution*. 1. painos. Caister academic press, Norfolk, UK. Sivut 159–198.

Sivonen K. 2009. Cyanobacterial toxins. E-kirjassa: Schaechter M (toim.). *Encyclopedia of Microbiology*. 3. painos. Elsevier. s. 290–307.

Spoof L, Błaszczuk A, Meriluoto J, Ceglowska M & Mazur-Marzec H. 2015. Structures and activity of new anabaenopeptins produced by Baltic Sea cyanobacteria. *Marine Drugs* 14 (1):8.

Stachelhaus T, Mootz H & Marahiel M. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 6: 493–505.

Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T & Neilan BA. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 7 (10): 753-764.

Vestola J, Shishido TK, Jokela J, Fewer DP, Aitio O, Permi P, Wahlsten M, Wang H, Rouhiainen L & Sivonen K. 2014. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a

nonribosomal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (18): E1909–E1917.

Voß B, Bolhuis H, Fewer DP, Kopf M, Moke F, Haas F, El-Shehawy R, Hayes P, Bergman B, Sivonen K, Dittmann E, Scanlan DJ, Hagemann M, Stal LJ ja Hess WR. 2013. Insights into the physiology and ecology of the brackish water adapted cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis. *PLOS One* 8 (3): 1–22.

Wang H, Fewer DP, Hol L, Rouhiainen L & Sivonen K. 2014. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (25): 9259–9264.

Waterbury JB. 2006. The cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. Kirjassa: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH ja Stackebrandt (toim.), *The Prokaryotes*, 4. osa, 3. painos. Springer-Verlag, New York, USA. Sivut 1053–1073.

Weast RC (toim.). 1989. *CRC Handbook of Chemistry, and Physics*, 70. painos. CRC Press, Boca Raton. s. D-221.

Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Rolf Müller, Wohlleben W, Breitling R, Takano E & Medema MH. 2015. antiSMASH 3.0 — a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research* 43 (W1): 237–243.

Welker M & von Döhren H. 2006. Cyanobacterial peptides — Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30 (4):530–563.

Wiley WC & McLaren IH. 1955. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *The Review of Scientific Instruments* 26 (12): 1150-1157.

8. Liitteet

Liite 1. Kasvatusalustojen valmistusohjeet

Z8 (Kotai 1972)

Kantaliuos Z8I

NaNO_3	46,7 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	5,9 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,5 g
H_2O	1 l

Kantaliuos Z8IX

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,7 g
NaCl	32,1 g
H_2O	1 l

Kantaliuos Z8II

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
Na_2CO_3	2,1 g
H_2O	1 l

Kantaliuos Z8III

Fe-liuos

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,8 g
0,1 N HCl	100 ml

EDTA-liuos (Ethylene diamine tetra-acetate)

EDTA	3,9 g
0,1 N NaOH	100ml

Sekoita 10 ml Fe-liuosta n. 900 ml:aan deionisoitua vettä. Lisää 9,5 ml EDTA-liuosta ja täytä deionisoidulla vedellä 1000 ml:ksi.

Kantaliuos Z8Salt

NaCl	87,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	37,5 g
H ₂ O	1 l

Hivenaineliuos

Valmista seuraavat kantaliuokset

1. Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	0,330 g/100ml
2. (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 2 H ₂ O	0,880 g/100ml
3. KBr	1,200 g/100ml
4. KJ	0,830 g/100ml
5. ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,870 g/100ml
6. Cd(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	1,550 g/100ml
7. Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	1,460 g/100ml
8. Cu(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	1,250 g/100ml
9. (NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	1,980 g/100ml
10. Cr(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	0,410 g/100ml
11. Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ · 24H ₂ O	4,740 g/100ml
12. V ₂ O ₅	0,089 g/l
13. H ₃ BO ₃	31,0 g
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3 g
Tislattu H ₂ O	1 l

Valmista hivenaineliuos sekoittamalla 1ml liuoksia 1-11 sekä 10 ml liuoksia 12 ja 13 noin 700 ml:aan vettä. Täytä 1000 ml:aan vedellä. Säilytä hivenaineliuos lasipullossa valolta suojattuna

Z8- ja Z8X-ravintoliuokset

Z8I- tai Z8IX-liuos	10 ml
Z8II-liuos	10 ml
Z8III-liuos	10 ml

Hivenaineliuos	1 ml
----------------	------

Z8Salt- ja Z8XSalt-ravintoliuokset

Z8salt-liuos	100 ml
Z8I- tai Z8IX-liuos	10 ml
Z8II-liuos	10 ml
Z8III-liuos	10 ml
Hivenaineliuos	1 ml

Kuplita noin 500 ml vettä hiilidioksidikaasulla noin puoli tuntia. Sekoita yllä olevat liuokset siihen ja täytä 1000 ml:ksi vedellä.

Autoklavoi 121°C 15 minuuttia. Autoklavoinnin jälkeen pH on 6,5-7.7

BHI-agar

Brain heart infusion agar, Lab M	49 g
(Sisältää:	
Aivo-sydän uute	17,5 g
Tryptoosi	10 g
Glukoosi	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ SO ₄	2,5 g
Agar	12 g)
Vesi	1 l

YM (Yeast and mold) –agar

Hiivauute	3 g
Mallasuute	3 g
Peptoni	5 g
Dekstroosi	10 g
Agar	20 g

Vesi	1 l
------	-----

RV (Ravinto) –agar

Peptoni	5 g
Lihauute	3 g
Agar	15 g
Vesi	1 l

R2A-agar (Reasoner & Geldreich 1985)

Hiivauute	0,5 g
Difco Proteose Peptone no. 3	0,5 g
Casamino Acids	0,5 g
Glukoosi	0,5 g
Tärkkelys	0,5 g
Natrium pyruvaatti	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
Agar	15,0 g
H ₂ O	1 l

Säädä pH:ksi 7,2 K₂HPO₄:lla ennen agarin lisäämistä. Lisää agar, kuumenna alusta kiehuvaaksi ja autoklavoi 15 min 121°C.

- Liite 2. DNA:n eristykseen käytettyjen liuosten valmistusohjeet

Lyysauspuskuri DNA:n eristykseen (Kolmonen ym. 2004)

1 M Tris-HCl
 121,1 g Tris-emästä
 800 ml H₂O

Säädetään HCL:llä 8:ksi. Täydennetään H₂O:lla 1000 ml:ksi.

10 % SDS

10 g SDS:ää

100 ml H₂O

0,5 M EDTA

93 g EDTA (etyleenidiamiinitetra-asetatti · Na₂ · H₂O

400 ml H₂O

Säädetään pH NaOH:lla 8:ksi. Täydennetään H₂O:lla 500 ml:ksi.

10 % Igepal-CA630

1,5 ml Igepal-CA630

13,5 ml H₂O

10 % deoksikolaatti

3,0 g deoksikolaatin natriumsuolaa

30 ml H₂O

0,5 M tiourea

0,38 g tioureaa

13,5 g H₂O

Steriilisuodatetaan liuos.

0,5 M ditiotreitoli

0,77 g ditiotreitolia

10 ml H₂O

Steriilisuodatetaan liuos.

100 ml lyysauspuskuria:

10 ml	1 M Tris-HCL
15 ml	10 % SDS
2 ml	0,5 M EDTA
10 ml	10 % deoksikolaatti
10 ml	10 % IGEPAL CA-630
50 ml	H ₂ O

Sekoitetaan liuokset keskenään. Autoklavoidaan 121 °C lämpötilassa 15 minuuttia. Lisätään steriilisuodatetut liuokset:

1 ml	0,5 M tiourea
2 ml	0,5 M ditiotreitoli

50 mM Tris-HCl – 100 mM EDTA – 100 mM NaCl –liuos

25 ml	1 M Tris-HCl
100 ml	0,5 M EDTA
2,92 g	NaCl

Täydennetään 500 ml:ksi H₂O:lla.

10 % CTAB - 0,7 M NaCl –liuos

4,1 g	NaCl
10 g	CTAB
100 ml	H ₂ O

Autoklavoidaan 121 °C lämpötilassa 15 minuuttia.

5 M NaCL

29,22 g NaCl

100 ml H₂O

Autoklavoidaan 121 °C lämpötilassa 15 minuuttia.